

DOSSIER DE CANDIDATURE

APPEL A CANDIDATURE

VOLET SCIENTIFIQUE

Centre national de référence des *Legionella*
Mandature 2017-2021

Demande de renouvellement

Sophie Jarraud & Gérard Lina

LEGIONELLES
Centre National de Référence

Institut des Agents Infectieux

LBMMS du CHU de Lyon
Hôpital de la Croix Rouse
Centre de Biologie Nord - Bâtiment O
103 Grande rue de la Croix Rouse
69004 LYON

@ : cnr-legionelles.univ-lyon1.fr

Sommaire

1. NOTE DE PRESENTATION ET ENGAGEMENTS	7
1.1- COURRIER OFFICIEL D'ACTE DE CANDIDATURE	7
1.2- PRESENTATION SYNTHETIQUE	8
1.3- DECLARATION PUBLIQUE D'INTERET	9
2. DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE	9
2.1- L'ORGANISATION PROPOSEE POUR REpondre AU CAHIER DES CHARGES	9
2.2- LES MOYENS DU LABORATOIRE AFFECTES AU CNR	10
2.2.1- <i>En matière de ressources humaines</i>	10
2.2.1.1- <i>Curriculum vitae</i> des responsables scientifiques	10
2.2.1.2- Personnels affectés au CNR et Organigramme	14
2.2.2- <i>En matière d'équipements et de logistique</i>	16
2.3- UN BREF DESCRIPTIF DES THEMATIQUES DE RECHERCHE DU LABORATOIRE DANS LE DOMAINE D'EXPERTISE DU CNR POUR LEQUEL IL CANDIDATE	18
2.4- LES CAPACITES TECHNIQUES DU LABORATOIRE	19
2.4.1- <i>liste des techniques disponibles pour le diagnostic, l'identification, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux ;</i>	19
2.4.2- <i>Liste des techniques disponibles pour le typage, y compris en terme de séquençage génomique</i>	22
2.4.3- <i>Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence disponibles : description (nombre de souches notamment), conditions de stockage, conditions de mise à disposition ;</i>	22
2.4.3.1. Collections de souches, antigènes et immun-sérums : nombre et caractérisation	22
2.4.3.2. Conditions de stockage	23
2.4.3.3. Conditions de mise à disposition	24
2.4.4. <i>Bases de données de séquences</i>	24
3. ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES (2012 - 2015)	24
3.1- RESUME DES ACTIVITES (2012-2015)	25
3.2- LES ACTIVITES AU TITRE DE L'EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE (2012-2015)	27
3.2.1. <i>Expertise dans le diagnostic des légionelloses</i>	27
3.2.1.1- Evolution des tendances (2012-2015)	27
3.2.1.2- Développement et mise à disposition de techniques	32
3.2.1.3- Techniques transférées vers d'autres laboratoires	34
3.2.1.4- Evaluation de méthodes, réactifs et trousse	34
3.2.2- <i>Expertise dans l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux</i>	38
3.2.2.1- Evolution des activités	38
3.2.2.2- Développements et mise à disposition de techniques	38
3.2.3- <i>Rôle d'observatoire des souches atypiques</i>	40
3.2.3.1- Activités	40
3.2.3.2- Evaluation de méthodes	44
3.2.4- <i>Expertise dans la détection des légionelles de l'environnement</i>	44
3.2.4.1- Développement et mise à disposition de technique	44
3.2.4.2- Evaluation de méthodes ou réactifs	46
3.2.4.3- Activités d'expertise	46
3.2.5- <i>Souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués</i>	49
3.3- CONSEIL AUX PROFESSIONNELS ET AUX AUTORITES DE SANTE	50
3.3.1- <i>Conseil aux professionnels</i>	50
3.3.1.1- Enseignements, formations et conseils	50
3.3.1.2- Accueil de stagiaires	52
3.3.1.3- Guides élaborés	54
3.3.1.4- Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :	54
3.3.2- <i>Conseil aux autorités de santé</i>	55
3.4- CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE	56
3.4.1- <i>Au niveau national</i>	56
3.4.1.1- Interface avec l'InVS	56
3.4.1.2- Réseau de partenaires – couverture nationale	57
3.4.1.3- Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des légionelloses en interface avec l'InVS	58
3.4.1.4- Expertise dans le typage des souches de légionelles	62

3.4.1.5- Caractérisation des souches et description des ST responsables de la majorité des cas de légionellose en France	66
3.4.1.6- Contribution à l'investigation des sources de contamination pour les cas sporadiques	72
3.4.1.7- Contribution à l'investigation des cas groupés	74
3.4.1.8- Etudes concourant à la surveillance (2012 – 2015)	76
3.4.2- <i>Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens</i>	82
3.5- CONTRIBUTION A L'ALERTE	86
3.5.1- <i>Procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal</i>	86
3.5.2- <i>Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux</i>	86
3.6- TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	88
4. LISTE DES PUBLICATIONS	91
4.1- PUBLICATIONS NATIONALES	91
4.2- PUBLICATIONS INTERNATIONALES	91
4.3- COMMUNICATIONS NATIONALES	93
4.4- COMMUNICATIONS INTERNATIONALES	95
4.5- CONFERENCES SUR INVITATION	97
4.6- OUVRAGE OU CHAPITRE D'OUVRAGE	97
4.7- BREVETS / PCT	98
4.8- CONTRIBUTION A DES PARTENARIATS OU COLLABORATIONS AVEC DES STRUCTURES OU INSTANCES NATIONALES OU INTERNATIONALES (EN SANTE ANIMALE OU ENVIRONNEMENTALE, OMS, ECDC, ...).	98
5. DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITE ET GARANTIES MISES EN ŒUVRE AU SEIN DU LABORATOIRE	98
5.1- ACCREDITATION	98
5.2- STRUCTURE QUALITE DU LABORATOIRE	98
5.3- CONTROLES DE QUALITE EXTERNES (CQE)	100
5.4- AUDITS	101
5.5- LOGICIEL DE GESTION DE LA QUALITE	101
5.6- AVANCEMENT DE LA DEMARCHE	101
6. DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE	102
7. PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2017-2021	103
7.1- ACTIVITES D'EXPERTISE	103
7.1.1- <i>Réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer</i>	103
7.1.2- <i>Les techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents en développement ou dont le développement est prévu</i>	104
7.1.2.1- Techniques pour le diagnostic des cas de légionelloses	104
7.1.2.2- Techniques pour l'identification des <i>Legionella</i>	105
7.1.2.3. Détection des <i>Legionella</i> dans l'environnement	105
7.1.3- <i>Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections ;</i>	106
7.1.3.1- Mode de constitution	106
7.1.3.2- Mode de stockage	106
7.1.3.3- Mise a disposition des collections	108
7.1.4- <i>Les travaux d'évaluations de techniques envisagés</i>	108
7.1.4.1- Contribution à l'évaluation des méthodes PCR	108
7.1.4.2- Evaluation des tests d'antigènes urinaires	108
7.1.5- <i>Les projets de transferts de techniques vers d'autres laboratoires</i>	109
7.1.6- <i>Les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR.</i>	109
7.1.6.1- Etudes des facteurs associés à la sévérité des cas de légionellose.	109
7.1.6.2- Evolution génétique de <i>Legionella</i> et évolution du microbote au cours des récives de légionellose ou d'échecs thérapeutiques	111
7.1.6.3- Diversité génétique de <i>Legionella</i> chez un même patient	111
7.2- ACTIVITES DE CONSEIL, FORMATION ET INFORMATION	112
7.2.1- <i>Projets de formation envisagés</i>	112
7.2.2- <i>Modalités de diffusion de recommandations et informations aux professionnels concernés et les modalités prévues de rétro-information vers l'ensemble des partenaires du CNR</i>	112
7.2.3- <i>Collaborations à des expertises éventuellement prévues auprès d'instances nationales ou internationales</i>	112
7.3- CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE	112
7.3.1- <i>projets de constitution, développement et animation de réseaux de partenaires</i>	112

7.3.2- Modalités de surveillance de la résistance aux anti-infectieux et aux biocides	113
7.3.3- Contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels	114
7.3.4- Contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux	114
7.3.5- Projets d'enquêtes ou études concourant à la surveillance.	115
7.3.6- Contribuer au développement et à l'évaluation de nouvelles techniques de typage	116
7.3.6.1- Typage des <i>Legionella pneumophila</i> par MALDITOF-MS	116
7.3.6.2- Typage des <i>Legionella pneumophila</i> par WGS	116
7.3.6.3- Développement d'un Sequence Based Typing utilisant 4 gènes à la place de 7 gènes	117
7.4- CONTRIBUTION A L'ALERTE	117

Figures

Figure 1. Organigramme fonctionnel du CNR	15
Figure 2. Espaces du R+1 de l'IAI (espaces en jaune) affectés au CNR des staphylocoques et des Légionelles	17
Figure 3. Evolution du taux d'incidence et du nombre de cas notifiés de légionellose en France entre 1988 et 2015 (données InVS).	27
Figure 4. Répartition des méthodes diagnostiques des cas de légionelloses déclarés entre 1997 et 2015 (Données InVS).	28
Figure 5. Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR	29
Figure 6. Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche disponible parmi l'ensemble des cas notifiés en France (données InVS).	29
Figure 7. Nombre de souches cliniques expertisées au CNR	31
Figure 8. Conduite à tenir pour l'identification d'une souche <i>Legionella</i>	42
Figure 9. Distribution en terme d'espèces et de sérogroupes des souches de <i>L. pneumophila</i> et de <i>L. non pneumophila</i> d'origine environnementale reçues et expertisées au CNR en 2015.	42
Figure 10. Distribution en terme d'espèces des souches <i>L. non pneumophila</i> d'origine environnementale expertisées au CNR en 2015	43
Figure 11. Distribution et évolution de la distribution de l'ADN étalon en nombre de laboratoires demandeurs depuis 2009.	45
Figure 12. Proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose et d'envoi des prélèvements au CNR.	51
Figure 13. Evolution du nombre de courriers envoyés aux ARS, laboratoires et InVS dans le cadre d'investigation de cas.	57
Figure 14. Schéma du système de surveillance de la légionellose en France (source : risque lié aux légionelles – Guide d'investigation et d'aide à la gestion – HCSP, 2013)	57
Figure 15. Distribution du taux d'incidence standardisé (sur le sexe et l'âge) de la légionellose selon la région (ancienne) de domicile en France métropolitaine, 2015 (chiffre en blanc). A été ajouté à cette carte de Santé Publique France, le nombre de souches d'origine clinique par région expertisé au CNR (en vert) et le nombre de souche rapporté à une incidence de 1 (en rouge).	58
Figure 16. Nombre de cas de légionellose notifiés en France de 2008 à 2015 selon le mois de début des signes, et pourcentage de souches disponibles	59
Figure 17. Nombre de cas par classe d'âge et par sexe des cas de légionellose notifiés en France de 2008 à 2015, avec ou sans souches disponibles	59
Figure 18. Evolution (Guérison, encore malade, Décès) des cas avec souche et des cas sans souche notifiés en France de 2008 à 2015	60
Figure 19. Pipeline d'assemblage des séquences NGS et d'extraction des séquences d'intérêt.	65
Figure 20. Répartition des différents sous-groupes de <i>L. pneumophila</i> séro groupe 1 (A) parmi les 2280 souches isolées entre 2008 et 2015 et (B) parmi les 346 souches isolées en 2015..	67
Figure 21. Répartition des 2 sous-groupes Mab 3/1 (+) et Mab 3/1 (-) de <i>L. pneumophila</i> séro groupe 1 parmi les 2280 souches isolées entre 2008 et 2015.	68
Figure 22. Evolution du nombre de souches présentant un pulsotype sporadique, endémique ou un profil déjà répertorié dans la base de données de pulsotypes des souches cliniques du CNR, (A) nombre de souches, (B) pourcentage par rapport à l'ensemble des souches d'origine cliniques analysées.	69
Figure 23. Distribution des souches des 23 ST prédominants en France parmi les isolats cliniques en 2014 et 2015	70
Figure 24. Evolution de la distribution des isolats cliniques des 3 ST majoritaires (ST1, ST23, ST47) en France de 2008 à 2015.	70
Figure 25. Evolution de la distribution des souches des ST émergents en France de 2008 à 2014.	71
Figure 26. Evolution du nombre de souches ST701 et apparentés (ST1904, 2116, 2130, 2131 et 259) de 2006 à 2015	72
Figure 27. Evolution du nombre d'investigations et du pourcentage d'investigations positives depuis 2000	73
Figure 28. Distribution en terme de sérogroupes des souches environnementales <i>L. pneumophila</i> (N=1244)	79
Figure 29. Distribution en terme de sous groupe et de ST des souches Lp1 isolées des Tars des 11 CNPE	80
Figure 30. Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001-03)	99
Figure 31. Organigramme qualité du laboratoire de Bactériologie	100
Figure 32. Suivi des performances Qualité du CNR des Légionelles.	100
Figure 33. Programme scientifique du projet ANR - Biomarqueurs bactériens et humains d'intérêt pronostique pour les légionelloses sévères	111

Tableaux

Tableau 1. Personnels affectés à l'activité du CNR des légionelles	15
Tableau 2. Evolution de l'activité d'expertise du CNR depuis 2012	26
Tableau 3. Couverture géographique d'où sont issues les souches d'origine clinique	30
Tableau 4. Origine des villes dans lesquelles ont été isolées les souches clinique en 2015	30
Tableau 5. Répartition en terme d'espèces de <i>Legionella</i> et de sérogroupes de <i>L. pneumophila</i> des souches d'origine cliniques isolées en France, 2006 – 2015.	31
Tableau 6. Recherche de <i>Legionella</i> dans les appareils d'oxygénothérapie ou d'aérosolthérapie de 2011 à 2015	47
Tableau 7. Bilans des 5 eaux issus d'appareils d'oxygénothérapie/aérosolthérapie positifs à <i>Legionella</i> en PCR	47
Tableau 8. Pouvoir discriminant des méthodes de typage de <i>Legionella pneumophila</i> sg 1	65
Tableau 9. Synthèse des résultats obtenus par la technique de Nested-SBT sur prélèvements pulmonaires.	66
Tableau 10. Répartition des différents sous-groupes de <i>L. pneumophila</i> séro groupe 1 parmi les 2280 souches isolées entre 2008 et 2015.	67
Tableau 11. Nombre de souches appartenant aux 23 STs les plus représentés parmi les souches cliniques isolées entre 2008 et 2015 *.	69
Tableau 12. Expositions à risque parmi les cas de légionellose survenus en France, 2013-2015 (données InVS)	72
Tableau 13. Investigations épidémiologiques réalisées entre 2008 et 2014	74
Tableau 14. Investigations épidémiologiques réalisées en 2015	74
Tableau 15. Modes de stockage de la collection du CNR	107

Annexes

Annexe 1. Déclarations publiques d'intérêt de Sophie Jarraud	
Annexe 2. Déclarations publiques d'intérêt de Gérard Lina	
Annexe 3. Lettre d'engagement de Sophie Jarraud à assurer la durée du mandat	
Annexe 4. Lettre d'engagement de Gérard Lina à assurer la durée du mandat	
Annexe 5. Evaluation de l'équipe de recherche <i>Legionella</i> pathogenesis par l'HCERES	
Annexe 6. Evaluation de l'équipe de recherche <i>Legionella</i> pathogenesis par l'INSERM (CSS7)	
Annexe 7. Programme de SymploLegio 2015	
Annexe 8. Précisions sur l'investigation des cas groupés de légionellose depuis 2011 – 2015	
Annexe 9. Sommaire du Manuel qualité du laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites du CHU de Lyon	
Annexe 10. Lettre d'agrément pour le transfert de matériel du CNR des légionelles	

1. NOTE DE PRÉSENTATION ET ENGAGEMENTS

1.1- COURRIER OFFICIEL D'ACTE DE CANDIDATURE

1.2- PRESENTATION SYNTHETIQUE :

Etat de la question scientifique

Les *Legionella*, bactéries ubiquistes et hydrotelluriques, sont considérées pour l'homme comme des bactéries opportunistes. *Legionella* est responsable de pneumonies aiguës sévères le plus souvent communautaires. En France 98% des cas confirmés de légionellose sont hospitalisés et 40% nécessitent une admission en réanimation. La létalité globale est estimée à 11 %, celle-ci peut atteindre plus de 30% chez les patients en réanimation ou les cas nosocomiaux. La légionellose reste une problématique de santé publique pour plusieurs raisons.

Le nombre de cas déclarés en France **ne diminue pas** ces dernières années voire augmente légèrement malgré la mise en place de nombreuses mesures réglementaires de surveillance et traitement notamment des tours aérorefrigérantes, des réseaux d'eau des établissements de santé, des hébergements pour personnes âgées, mesures qui ont été étendu récemment aux réseaux d'eau chaude sanitaire des établissements recevant du public. Une meilleure connaissance de la colonisation des eaux chaudes sanitaires des habitats collectifs et individuels en France pourrait permettre d'évaluer le risque associé à ces réseaux. **La voie de transmission** reconnue chez l'homme est **l'inhalation d'aérosols infectieux** provenant d'environnements aquatiques. La contamination à partir de poussière de sols contaminés a été décrite notamment pour l'espèce *L. longbeachae*, suggérant que des voies de contamination annexes pour *L. pneumophila* pourraient être investiguées. **La source de contamination n'est identifiée que dans un nombre très limité de cas.** Une exposition à risque n'est rapportée que pour 1/3 des patients. L'hypothèse de l'implication de sources de contamination non encore investiguées ou émergentes tels que de nouveaux dispositifs de climatisation, des dispositifs collectifs de brumisations d'eau, des dispositifs domestiques, ou l'implication d'environnements non hydriques comme la terre... devra être explorée sur un plan épidémiologique et microbiologique. Pour cela il est important que la proportion de cas avec isolement de souches continue de progresser. De façon très intéressante la **transmission interhumaine** a été décrite pour un patient pour la première fois en 2016 ce qui génère de nombreuses questions sur la place de ce mode de transmission, et si ce mode de transmission exceptionnelle pourrait être spécifique de certains fonds génétiques. De la même manière, alors que l'antibiorésistance n'avait jamais été décrite chez *Legionella*, deux études très récentes ont décrites l'existence de **Legionella résistante aux fluoroquinolones** chez 3 patients, un patient pour lequel la souche résistante a été isolée et deux patients pour lesquels une acquisition de résistance au cours du traitement a été mise en évidence par *Next Generation Sequencing*. Ce point encourage à poursuivre la veille sur la résistance des légionelles aux antibiotiques et conforte l'intérêt des nombreux travaux réalisés ces dernières années par le CNR sur la résistance des *Legionella* aux macrolides. Enfin, du fait probablement du meilleur diagnostic des légionelloses, le CNR a décrit ces dernières années des **formes persistentes ou des récidives de légionellose** notamment chez les personnes fortement immunodéprimées qu'il faudra explorer.

Parmi la cinquantaine d'espèces de *Legionella*, l'espèce *L. pneumophila* est associée à plus de 90 % des cas de légionellose diagnostiqués dans le monde, et parmi cette espèce, le sérogroupe 1 est de loin le plus important en pathologie humaine. Cette prédominance clinique de *L. pneumophila* sérogroupe 1 contraste avec l'environnement où la diversité des espèces est importante. Le fait marquant ces dernières années est la description de **certains clones de L. pneumophila sérogroupe 1 (Lp1)** répandus mondialement et **fortement associés aux cas de légionellose**. Ainsi 5 clones (ST1, ST23, ST47, ST37 et ST62) sont associés à plus de 40% des légionelloses en Europe. Les analyses de génomiques comparatives qui se sont développées ces dernières années ont montré que ces clones ont émergés indépendamment et qu'à la différence de la grande diversité au sein de l'espèce, ces souches montrent entre elles une très forte identité (en excluant les régions de recombinaison) suggérant une origine clonale récente. La mise en évidence qu'une grande proportion de cas de légionellose soit due à des clones apparus récemment et dispersés à l'échelle internationale est surprenante pour une bactérie environnementale traditionnellement considérée comme un pathogène opportuniste. Ces données suggèrent que l'homme a récemment créé de nouvelles niches environnementales facilitant leur émergence. L'homme pourrait ainsi contribuer à la propagation et la sélection de clones qui sont mieux adaptées à l'infection humaine.

Enfin, sur le versant de l'investigation des cas de légionellose l'évolution majeure de ces dernières années concerne l'utilisation du **séquençage entier du génome (WGS)**. Les quelques épidémies investiguées par cette méthode ont montré sa puissance. Elle devrait nous permettre d'identifier les sources de contamination, là où le Sequence-Based Typing (SBT) devenait non performant car de nombreux STs étaient communs, répandus dans l'environnement et responsables de nombreux cas épidémiologiquement non reliés. Une collaboration internationale est en cours pour définir la méthode de WGS de référence standardisée.

Les enjeux de Santé Publique pour les légionelloses sont de mieux prévenir cette maladie et de diminuer sa morbidité et sa mortalité. Dans ce contexte, les principaux enjeux sont :

- A- L'amélioration de la surveillance et de la prévention environnementale
- B- L'exploration de sources de contamination non investiguée jusqu'alors
- C- L'amélioration du diagnostic des cas de légionellose et l'exploration des formes atypiques
- D- L'identification de marqueurs bactériens et d'hôte associés à l'acquisition et à la sévérité des cas de légionellose
- E- La veille sur la sensibilité des légionelles aux antibiotiques et aux biocides.
- F- La standardisation au niveau européen du WGS et notamment du cgMLST pour l'investigation des cas de légionelloses

Candidature pour le CNR des *Legionella*

Dans ce contexte, nous souhaitons par ce dossier proposer notre candidature afin de poursuivre les missions de CNR qui nous ont été confiées jusque là. Lors de ces 5 dernières années correspondant au précédent mandat, nous avons répondu nous semble-t-il de manière appropriée aux missions et objectifs majeurs du CNR des *Legionella* tels que fixés par Santé Publique France. Les éléments marquants de notre bilan sont sur un plan de la surveillance une participation active aux investigations de cas groupés ou isolés dans le cadre d'un réseau de collaborations qui s'est largement étendu et en y associant le développement de nouvelles méthodes de typage facilitant ces investigations. Sur le plan bactériologique, nous avons dans le cadre de collaborations apporté des connaissances remarquées sur la génomique de *Legionella*. Nous avons caractérisé les mécanismes impliqués dans la résistance de *Legionella* aux macrolides et mis en place des outils génomiques permettant une veille de la résistance de *Legionella* aux antibiotiques. Enfin, nos activités de développement, d'information et de conseils sur les stratégies de diagnostic et de prévention participent à répondre aux enjeux de santé publique causés par cette bactérie.

Au cours de ce prochain mandat, nous souhaitons poursuivre notre rôle central dans la surveillance clinique et environnementale de la légionellose et par différentes approches mieux comprendre la part des différents facteurs (environnementaux, bactériens, hôte) qui conduisent au développement et à la sévérité de la maladie. Par ailleurs le point central dans l'investigation des cas de légionellose sera la transition des méthodes de typages actuelles (SBT, PFGE) vers le WGS. Nous avons au cours de ces dernières années mis en place les différents outils permettant son déploiement et participons au groupe international pour la standardisation de cette méthode.

Nos forces résident dans l'expérience et les compétences acquises sur *Legionella* depuis la découverte de cette bactérie et au réseau de collaboration mis en place tant sur le territoire français qu'au niveau international. L'équipe proposée a un large ancrage hospitalo-universitaire avec la participation de cliniciens, de microbiologistes et de chercheurs et est adossée à l'équipe pathogénie des légionelles du Centre de Recherche International en Infectiologie (CIRI). Ce centre de recherche regroupe 22 équipes labélisées par l'INSERM, le CNRS, l'Université Lyon1, l'Ecole Normale Supérieure de Lyon. Enfin le CNR de part sa future implantation en Janvier 2017 à l'Institut des Agents Infectieux à l'hôpital de la Croix Rousse tout comme les 3 autres CNR candidats à Lyon (Staphylocoques, virus respiratoires, entérovirus) bénéficiera de l'ensemble de l'infrastructure et des technologies de ce centre.

1.3- DECLARATION PUBLIQUE D'INTERET :

Ces déclarations publiques d'intérêt de Sophie Jarraud et Gérard Lina sont en annexe 1 et 2.

2. DESCRIPTIF DES CAPACITÉS DU LABORATOIRE

2.1- L'ORGANISATION PROPOSEE POUR REpondre AU CAHIER DES CHARGES

L'ensemble des laboratoires de Biologie des Hospices Civils de Lyon est regroupé au sein d'un seul Laboratoire de Biologie Médicale Multisite (LBMMS) du CHU de Lyon. Dans le cadre de la restructuration des activités de Biologie du CHU de Lyon, le regroupement de l'ensemble des activités de microbiologie (Bactériologie, Virologie, Parasitologie-Mycologie, Hygiène environnementale) a été acté par les instances en 2011. Ce projet aboutira en janvier 2017 à la création d'un Institut des Agents Infectieux (IAI) sur le site de l'hôpital de la Croix Rousse dans un bâtiment existant, reconfiguré pour accueillir toutes les disciplines de la microbiologie. Cet institut sera l'un des deux plus grands laboratoires de microbiologie de CHU en France, regroupant environ 180 personnels biologistes et techniciens. Il assurera une prise en charge de la microbiologie 24h/24, 7 jours/7 (modèle 24-7) pour environ 5000 lits d'hospitalisation grâce à une plateforme de Bactériologie automatisée, une plateforme de Sérologie infectieuse, une plateforme de Biologie moléculaire, une unité de diagnostic des Mycobactéries à vocation régionale, une unité de Virologie conventionnelle et une autre de Parasitologie-Mycologie hors automatisation. Il hébergera par ailleurs, s'ils sont renouvelés en 2017 les 2 CNR pour les Maladies transmissibles de bactériologie (Staphylocoques, Légionelles) et 2 CNR associés en virologie (CNR associés pour entérovirus - parechovirus, et des virus respiratoires) et un Centre de Ressources Biologiques. Les activités des CNR de bactériologie (staphylocoques et légionelles) seront installées au 1er étage du bâtiment ou ils bénéficieront de locaux spécifiquement adaptés à leur activité (cf infra). Les CNR bénéficieront par ailleurs de l'environnement de l'IAI pour ce qui concerne les fonctions transverses et les équipements spécialisés.

La totalité des activités du CNR des légionelles correspondant au cahier des charges de l'InVS sera effectuée dans ce laboratoire. Par ailleurs, tous les aspects relevant de la recherche physiopathologique et amont seront principalement développés dans l'équipe Pathogénie des légionelles de l'unité INSERM U1111, Centre International de Recherche en Infectiologie situé sur le Campus de la Doua (Resp. Patricia Doublet, CoPI Sophie Jarraud).

2.2- LES MOYENS DU LABORATOIRE AFFECTES AU CNR :

2.2.1- En matière de ressources humaines :

Le projet pour le CNR des *Legionella* est présenté avec une Co-direction assurée par Sophie Jarraud et Gérard Lina. Toutes les personnes mentionnées dans l'organigramme auront un rôle majeur en participant selon leur spécificité à l'accomplissement des missions du CNR.

2.2.1.1- Curriculum vitae des responsables scientifiques

Responsable : Sophie JARRAUD

Sophie Jarraud s'engage à assurer la durée du mandat en cas de nomination. La lettre d'engagement est reportée en annexe 3.

Situation actuelle et statut

- Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier
- Co-Responsable de l'équipe pathogénie des légionelles International Center for Infectiology Research INSERM Unit 1111
- Directeur du CNR des Légionelles depuis 2012

Cursus

- Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier (2002), Hors classe (2015)
- Assistante Hospitalo-Universitaire en Microbiologie (1998 – 2002)
- Attachée (11 vacations par semaine) en Microbiologie (1996 – 1998)
- Interne des Hôpitaux de Lyon, DES de Biologie Médicale (1992 – 1996)

Etablissements :

N° RPPS : 10004105929

Numéro ordinal : 00105331

Adresse hospitalière (en Janvier 2017)

Institut des Agents Infectieux
Hopital de la Croix-Rousse,
Centre de Biologie Nord - Bat O
103 Grande Rue de la Croix Rouse
69004 LYON
Tel : 04. 72. 12. 96. 65
Fax : 04. 72. 35. 73. 35
Courriel : sophie.jarraud@chu-lyon.fr

Adresse universitaire

Laboratoire de Bactériologie –
CIRI, U1111 INSERM-CNRS-UCBL-ENSL
Domaine Scientifique de la Doua, Université Lyon 1
Bat. André LWOFF, 3ème étage 10 rue Raphaël Dubois
69622 Villeurbanne
Tel : 04. 78. 77. 86. 42
Fax : 04. 78. 77. 86. 58
Courriel : sophie.jarraud@univ-lyon1.fr

Diplômes / Formation :

- Visitor worker, Public Health England, London, 2016
- Habilitation à Diriger des Recherches, UCB - Lyon I, 2003
- Thèse de Doctorat d'Université, UCB - Lyon I, 2000
- Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, UCB - Lyon I, 1996
- Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale, UCB - Lyon I, 1996
- Diplôme d'Etudes Approfondies d'Ecologie Microbienne, UCB - Lyon I, 1996

Responsabilités administratives hospitalières

- Membre du groupe de travail "Comité de l'eau" des Hospices Civils de Lyon (depuis 2000)
- Membre du Conseil Scientifique de la plateforme NGS, Hospices Civils de Lyon (depuis 2014)

Responsabilités administratives universitaires

- Membre élu du conseil de Gestion de la Faculté de Médecine Lyon Nord (collège B), (2005-2009)
- Membre élu du Conseil National des Université (CNU) – sous section 45-01, collège B (depuis 2013)

Responsabilités administratives nationales et européennes

- Directeur du Centre National de Référence des légionelles (depuis 2012)
- Directeur adjoint du Centre National de Référence des légionelles (2006 - 2011)
- Membre élu du comité exécutif de l'European Study Group of Legionella Infection (ESGLI), trésorière (depuis 2015)
- Nomination comme contact point – laboratory expert pour la maladie des légionnaires au niveau Européen (2009)

Membre de groupes de travail sur *Legionella*

- Membre du groupe paritaire d'experts pour la mise en place d'une chaîne d'étalonnage pour le dénombrement des légionelles par PCR en temps réel dans l'environnement, groupe mise en place par le Ministère de la Santé et des Solidarités et par l'association AGLAE (Association générale des Laboratoires d'Analyse de l'Environnement). (2007-2008)
- Membre du COPIL de la Plate forme légionelles mise en place par l'AFNOR (Agence Française de Normalisation) (depuis 2007)
- Membre de la commission AFNOR de Normalisation : Détection des *Legionella* – méthode alternative, AFNOR T90E, Norme XPT 90-471 puis NFT 90-471 (depuis 2007)
- Membre du groupe de travail « détection des légionelles dans l'eau », ANSES (2010 - 2011)
- Membre du groupe de travail « Actualisation de la Mise Au Point sur la légionellose », Afssaps. (2010)
- Comité de pilotage (COPIL) Etude sur l'impact des retombées de panaches émis par les tours aéro-réfrigérantes des centres nucléaires de production d'électricité d'EDF sur la survenue de cas de légionellose (ANSES, InVS, CNR) (2010 – 2012)

Grants

Coordinateur

- **AFSSET 2008-2010** - LEGIOADHER, Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la cytoadhérence de *Legionella pneumophila* aux cellules épithéliales
- **FRM 2014-2017** Large-scale RNA-seq analysis of intracellularly grown *Legionella pneumophila* strains. Programme Analyse Bio-informatique pour la recherche en Biologie 2013, en collaboration avec Guy Perrière LBBE UMR5558, Lyon
- **ANR/DGOS 2016-2020** PROGLEGIO, Prognostic value of microbial and host determinants for Legionnaires' disease outcome, Programme de recherche translationnelle en santé

Responsabilité scientifique pour l'équipe

- **Appel à Recherche Ciblée Légionelles AFSSET (2005-2007)** : « Genome based epidemiology: towards the prediction of the risk related with a strain ». Coordinateur scientifique : Carmen Buchrieser Institut Pasteur Paris, Unité de Génomique des Microorganismes Pathogènes.
- **Programme ANR-06-Santé-Environnement et Santé-Travail (2006-2010)**, LEGIOAEROPATHO, Impact of environmental factors on survival and pathogenicity of airborne *Legionella*. Coordonnateur principal Jacques Frères (LCEE Poitiers), projet réalisé en collaboration avec le CSTB Marne la Vallée / DESP-EPHE Nancy) .
- **Projet Génoscope, 2006**. Comparative genomics of pathogenic and non-pathogenic *Legionella pneumophila* to understand virulence in humans. GENOSCOPE - Centre national de séquençage, Evry. Coordinateur du projet, Carmen Buchrieser de l'Institut Pasteur de Paris
- **Appel à Recherche Ciblée Légionelles 2007 AFSSET (2007 – 2009)** : Rôle des amibes de l'environnement sur la colonisation, la prolifération et la virulence des bactéries du genre *Legionella*. Coordinateur principal Michel Pelandakis, réalisé en collaboration avec 2 autres équipes universitaires, Danièle Atlan (Lyon), Dominique Schneider (Grenoble)
- **Appel à projet APR EST 2010 ANSES (2010-2012)**. Epidémiologie moléculaire et modélisation spatiale dynamique des populations de *Legionella pneumophila* dans l'environnement

Publications

Publication Medline : 95

ISI – h- index : 26, nombre de citations : 4117

SIGAPS 1998 – 2017 : 1089

Cinq publications récentes :

Gomez-Valero L, Rusniok C, Jarraud S, Vacherie B, Rouy Z, Barbe V, Médigue C, Etienne J, Buchrieser C. Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the *Legionella pneumophila* genomes. **BMC Genomics**. 2011 Nov 1;12:536.

Den Boer JW, Euser SM, Nagelkerke NJ, Schuren F, Jarraud S, Etienne J. Prediction of the origin of French *Legionella pneumophila* strains using a mixed-genome microarray. **BMC Genomics**. 2013 Jul 1;14:435.

Gomez-Valero L, Rusniok C, Rolando M, Neou M, Dervins-Ravault D, Demirtas J, Rouy Z, Moore RJ, Chen H, Petty NK, Jarraud S, Etienne J, Steinert M, Heuner K, Gribaldo S, Médigue C, Glöckner G, Hartland EL, Buchrieser C. Comparative analyses of *Legionella* species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. **Genome Biol**. 2014;15(11):505.

Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebel C, Timsit JF, Schneider D, Maurin M. Hidden Selection of Bacterial Resistance to Fluoroquinolones In Vivo: The Case of *Legionella pneumophila* and Humans. **EBioMedicine**. 2015 Jul 17;2(9):1179-85.

Khodr A., E. Kay, L. Gomez-Valero, C. Ginevra, P. Doublet, C. Buchrieser, S. Jarraud. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. **Infection, Genetics and Evolution**, 2016

Responsable adjoint : Gérard LINA

Gérard Lina s'engage à assurer la durée du mandat en cas de nomination. La lettre d'engagement est reportée en annexe 4.

Gérard Lina
Né le 27/05/1963
Nationalité française
Situation de famille : marié, 4 enfants

Adresse personnelle
105 Grande rue de la Guillotière
69007 Lyon
Tél. : 04 72 73 34 02

Adresses professionnelles

Laboratoire de Bactériologie et des Mycobactéries	Centres Nationaux de Références des Légionelles et des Staphylocoques	INSERM 1111
Centre de Biologie Sud 165 chemin du Grand Revoyet 69495 Pierre Bénite cedex Tél. : 04 78 86 44 93 Fax : 04 72 86 32 80 e-mail : gerard.lina@chu-lyon.fr	Centre de Biologie Est 59 boulevard Pinel 69677 Bron cedex Tél. : 04 72 12 96 67 Fax : 04 72 35 73 35	Université Lyon 1 - Site Laennec 7 rue Guillaume Paradin 69372 Lyon cedex 08 Tél. : 04 78 77 86 57 Fax : 04 78 77 86 58

N° d'inscription au Conseil National de l'Ordre des Médecins : 69/11501
N° ADELI : 691115018 ; N° RPPS : 10003066726 ; N° CPS : 2200526748

I. Fonctions actuelles

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Directeur du Laboratoire de Bactériologie et des Mycobactéries du Centre de Biologie Sud

II. Coursus et diplômes

Cursus hospitalier

1988-1994- Interne des Hôpitaux de Lyon, spécialité Biologie Médicale
1994-1995- Interne médaille d'or des Hôpitaux de Lyon
1995-1998- Assistant Hospitalo-Universitaire (Service de Bactériologie, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, Pr Fleurette puis Pr Etienne)
1998- Praticien Hospitalier (concours 1998)

Cursus universitaire

1995-1998- Assistant Hospitalo-Universitaire (Service de Bactériologie, Hôpital Edouard Herriot, Pr Fleurette puis Pr Etienne)
1998- Maître de Conférence des Universités (concours 1998)
2009- Professeur des Universités (concours 2009)

Diplômes

1990- Certificat d'Immunologie - Immunopathologie - Faculté de Biologie Humaine, Université Claude Bernard - Lyon I
1991- Diplôme d'études approfondies de Différenciation, Génétique et Immunologie, Faculté de Biologie Humaine, Université Claude Bernard - Lyon I
1994- DES de Biologie Médicale, Université Claude Bernard - Lyon I
1994- Thèse de Doctorat en Médecine, Université Claude Bernard - Lyon I
1996- Thèse de Doctorat de l'Université, Université Claude Bernard - Lyon I
2000- Habilitation à Diriger la Recherche, Université Claude Bernard - Lyon I

III. Formations complémentaires

1996- Compétence nationale en radioprotection (sources scellées et non-scellées), Institut de Physique Nucléaire de Lyon/Université Claude Bernard - Lyon I
2001- Formation spéciale à l'expérimentation animale pour les cadres biologistes, Ecole vétérinaire de Lyon

IV. Responsabilités Administratives

Responsabilités administratives hospitalières

2009- Membre du comité des Hospices Civils de Lyon de pilotage des immunoglobulines humaines normales
2012- Directeur du Laboratoire de Bactériologie et des Mycobactéries du Centre de Biologie et Pathologie Sud
2012- Coordinateur Médicale du Centre de Biologie et Pathologie Sud

Responsabilités administratives universitaires

2001-2002 Membre du groupe de travail sur la mise en place pour l'année universitaire 2001-2002 du module optionnel du deuxième cycle "Stratégie des examens complémentaires" pour les quatre Facultés de Médecine de l'Université Claude Bernard - Lyon I
2001-2006 Membre du conseil d'orientation de l'IFR62
2005- Membre de la commission de pédagogie interrégionale – DES de biologie Médicale
2007-2009 Membre du conseil de laboratoire de l'INSERM U851
2008-2010 Membre du groupe de travail patrimoine scientifique de l'Université Claude Bernard - Lyon I
2008- Membre du conseil de l'antenne santé pour la formation continue, Université Claude Bernard - Lyon I
2010- Membre de la commission pédagogique P2 et D1 de l'UFR de médecine Lyon Est
2010- Membre du conseil de direction de l'INSERM U1111

Responsabilités administratives nationales et européennes

1994- Membre du Centre National de Référence des Staphylocoques.
2010- Membre du Centre National de Référence des Legionelles.
2012- Co-directeur du Centre National de Référence des Legionelles.
2010- Membre du Conseil d'Administration de la Société Française de Microbiologie.
2016- Président de la Société Française de Microbiologie.
2011- Membre du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
2012- Secrétaire du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
2014- Membre du Steering comité de *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

Autres fonctions ou responsabilités

2008- Editeur associé pour *Clinical Microbiology and Infection*.
2012-2015 Président de l'association pour l'organisation des réunions interdisciplinaires de chimiothérapie anti-infectieuse
2012- Conseiller scientifique auprès de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé pour le Contrôle National de Qualité en bactériologie.

V. Appartenance à des sociétés savantes

1995- Membre de la Société Française de Microbiologie
2008- Membre de l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

VI. Activités de recherche

Notre travail de recherche s'intègre entièrement dans la thématique du Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111 - CNRS UMR5308 - Université Lyon 1 - ENS de Lyon. Il concerne la l'exploration de l'interaction hôte-bactérie à travers trois genres bactériens : *Staphylococcus*, *Legionella* et *Mycobacterium*. Le fruit de ce travail est à l'origine de plus de 200 publications dans des revues de langue anglaise à comité de lecture, de 30 présentations orales sur invitation des travaux de recherche et 4 brevets.
Facteur h : 50 ; Score SIGAPS 2248

2.2.1.2- Personnels affectés au CNR et Organigramme

L'IAI emploie environ 180 personnes réparties dans les différents secteurs et plateaux présentés ci-dessus (paragraphe 2.1). Les personnels affectés au CNR des légionelles comprennent des personnels affectés spécifiquement au CNR (techniciens, ingénieurs) et des personnels qui assurent une partie de leur temps au CNR (biologistes, secrétaires, cadres médico-techniques). Pour chacun de ces personnels, la quotité de temps consacrée à l'activité du CNR est précisée dans le document spécifique (état des emplois rémunérés).

L'organigramme fonctionnel du CNR est présenté figure 1.

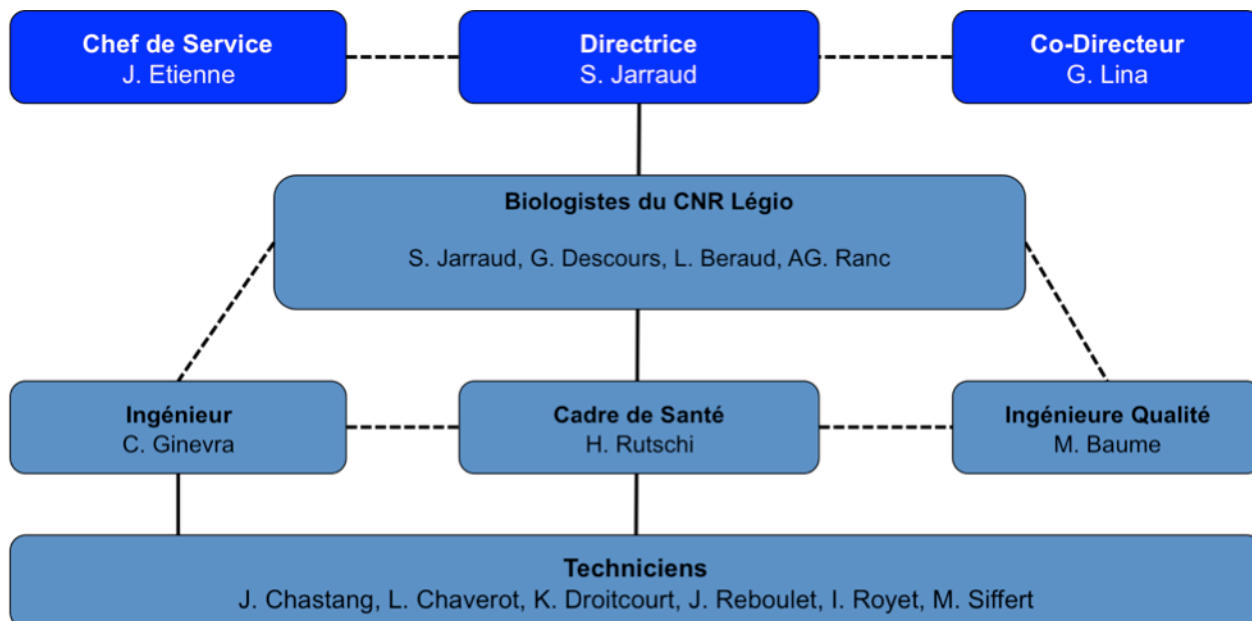


Figure 1. Organigramme fonctionnel du CNR

L'ensemble des personnels est présenté tableau 1. Les biologistes partagent l'ensemble des 4 missions du CNR (expertise, conseil, surveillance épidémiologique, alerte) ; sont indiqués dans le tableau quelques compétences spécifiques, néanmoins partagées par tous. Concernant les techniciens, ils partagent les activités des différents secteurs du CNR notamment les postes d'identification de souches, de diagnostic, de biologie moléculaire, de typage, de détection environnementale...

Tableau 1. Personnels affectés à l'activité du CNR des légionelles

Noms et qualifications	Coordonnées
Sophie Jarraud (directeur) PH - IAI MCU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 12 96 65 ou 04 72 77 86 42 sophie.jarraud@univ-lyon1.fr
Gérard Lina (Directeur adjoint) PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Sud	Tél : 04 72 12 96 67 ou 04 78 86 12 33 ou 04 72 77 86 57 gérard.lina@chu-lyon.fr
Jérôme Etienne (Physiopathologie et épidémiologie) PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 12 96 21 ou 04 72 77 86 57 jerome.etienne@chu-lyon.fr
Florence Ader (infectiologie) PH – Service des maladies infectieuses PU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 15 60 florence.ader@univ-lyon1.fr

Laetitia BERAUD (environnement, évaluation de réactifs) PH – IAI	Tél : 04 72 12 95 81 laetitia.beraud@chu-lyon.fr
Pascale Girardo (gestion informatique) Praticien attaché – IAI	Tel : 04 72 12 96 70 pascale.girardo@chu-lyon.fr
Anne-Gaëlle Ranc (épidémiologie) Assistante hospitalière - IAI Assistante universitaire - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 12 96 01 anne-gaelle.ranc@chu-lyon.fr
Ghislaine Descours (résistance) PH - IAI MCU – Faculté de Pharmacie	Tél : 04 72 12 96 66 ghislaine.descours@chu-lyon.fr
François Vandenesch PH – IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tel : 04 72 12 96 25 francois.vandenesch@chu-lyon.fr

Ingénieurs (Hospices Civils de Lyon)	
Christophe Ginevra (Biologie moléculaire et cellulaire, Bio-informatique) Ingénieur IAI	Tel : 04 78 77 86 42 christophe.ginevra@chu-lyon.fr
Maud Baume (Qualité) Ingénieure IAI	Tel : 04 27 85 52 58 maud.baume@chu-lyon.fr

Techniciens (Hospices Civils de Lyon)	
Isabelle Royet Karine Droitcourt Jérémy Reboulet Joelle Chastang Marielle Siffert Lucie Chaverot	

Cadre	
Hélène Rutschi	Tel : 04 27 85 50 46 helena.rutschi@chu-lyon.fr

Secrétaires	
Marie Benedicte Bonnet-Eymard	marie-benedicte.bonnet@chu-lyon.fr
Blandine Bavitot	blandine.bavitot@chu-lyon.fr

H : hospitalier, U : universitaire

2.2.2- En matière d'équipements et de logistique :

➤ Surface des locaux – plan :

L'IAI va occuper le Centre de Biologie pour l'Hôpital de la Croix Rousse. Le projet de restructuration de la biologie a conduit à des opérations de relocalisation des activités spécialisées entre les différents sites de HCL, l'ensemble de la microbiologie se concentrant sur l'Hôpital de la Croix Rousse (pole Nord),... Ainsi, hormis un plateau de biochimie-

hématologie d'urgence destiné aux patients de l'hôpital de la Croix Rousse, plateau qui occupe un demi étage du bâtiment, le reste des 5 étages du bâtiment soit environ 4500 m² seront occupés à terme par la Microbiologie :

- le R+5 est occupé par les laboratoires L3 (Virologie, Mycobactéries, Biotox), la virologie cellulaire, les CNR de Virologie,
- le R+4 est dévolu au plateau de Biologie Moléculaire Infectieuse (manuelle et automatisée, dont une partie génomique),
- le R+3 sera occupé au printemps 2017 par le plateau de Bactériologie automatisée 24/24,
- le R+2 est occupé à moitié par le plateau de Biochimie-Hématologie 24/24 et par le plateau de Sérologie Infectieuse manuelle et automatisée,
- le R+1 héberge le CNR des staphylocoques, le CNR des Légionelles, l'hygiène environnementale et la Parasitologie-Mycologie non automatisée.

Etage des CNR de Bactériologie. Sans être un laboratoire autonome au sein du bâtiment, cet étage a été conçu d'emblée pour héberger les activités des CNR de Bactériologie, incluant les approches conventionnelles et de biologie moléculaire (cf plan). Les CNR bénéficient par ailleurs de toute l'infrastructure et des différents plateaux de l'IAI, notamment les outils d'identification MALDI-TOF et d'antibiogramme du plateau de microbiologie 24/24 (R+2), les outils de biologie moléculaire et d'analyse bioinformatique du plateau de Biologie Moléculaire (R+4) et toutes les facilités logistiques du bâtiment (laverie-stérilisation...). Cela inclut notamment l'existence d'un secrétariat centralisé pour l'ensemble de l'IAI assurant une réponse téléphonique 6 jours sur 7 grâce à un n° unique. En dehors des heures ouvrables et le week end, ce numéro est transféré vers le n° d'astreinte de microbiologie sur site. Ainsi, un interlocuteur pour le CNR sera toujours joignable.

L'équipe pathogénie des légionelles localisée sur le site de la Doua ne comporte pas de secteur spécifique pour le CNR des légionelles. L'activité du laboratoire est consacrée à l'étude de la physiopathologie des infections à *Legionella* (Cf 2.3).

Figure 2. Espaces du R+1 de l'IAI (espaces en jaune) affectés au CNR des staphylocoques et des Légionelles



➤ Principaux équipements :

Sur le plan des équipements, les principaux équipements dont dispose le CNR qu'ils aient été acquis sur des crédits InVS ou du fait de la mutualisation avec les autres secteurs du laboratoire, sont ceux d'un laboratoire de microbiologie ayant des approches moléculaires et cellulaires. Ainsi, entre les laboratoires hospitaliers et universitaires, le CNR a accès à tout un équipement technologique comme des appareils PCR temps réels (Light Cycler 1, 2 et 480, Bio-rad DNA Engine chromo4, et autres...), de nombreux thermocycleurs conventionnels, des extracteurs d'ADN, des hottes à flux et des PSMs, trois systèmes d'électrophorèse en champs pulsé Chef Biorad, un système informatique de traitement des images électrophorétiques et d'analyse des données, des cytomètres de flux (utilisé pour étudier l'interaction hôte bactérie au niveau cellulaire), un système de chromatographie liquide (utilisé pour la purification des protéines

recombinantes), un système MALDI-TOF pour l'identification bactérienne (Axima Shimatsu couplé à la base de données Saramis), des lecteurs de plaques spectro-fluoro-luminomètre thermostatés et agités (Tecan), des ensemeuseurs (EasySpiral), des centrifugeuses de différentes capacités, et tout le matériel nécessaire à la stérilisation du matériel et à la décontamination.

Du fait de l'implantation du CNR des légionelles au sein de l'Institut des Agents Infectieux regroupant les laboratoires de bactériologie, virologie et parasitologie de Lyon ainsi que 2 autres CNR et 1 laboratoire associé (Staphylocoques, Enterovirus et grippe), l'accès à de nouveaux équipements sera facilité.

Sur le plan plus spécifique des techniques de Next Generation Sequencing (NGS), les Hospices Civils de Lyon ont mis en place une plateforme dédiée au diagnostic par les techniques de séquençage haut débit nouvelle génération. Cette plateforme compte 1 séquenceur Nextseq Illumina, 2 séquenceurs Ion torrent (1 PGM et 1 Proton) ainsi que tout l'équipement pour la préparation des banques : 1 Covaris, 1 AB builder, 1 Ion Chef, 2 One touch, 2 ES-one touch, 2 automates de pipetage (1 Sciclone et 1 Zéphir, Caliper). La plateforme possède également les ressources pour l'analyses et le stockage des données générées avec 6 stations de travail informatique windows et/ou Linux équipées plusieurs logiciels d'analyses, 2 serveurs de stockage sécurisé à la direction de l'informatique des Hospices Civils de Lyon (DSII), un accès sécurisé à un cluster de calcul haute capacité (Université de Bourgogne) et un groupe bioinformatique composé de bioinformaticiens, de biostatisticiens et de biologiste développant conjointement des outils d'analyses mutualisés pour les différents services. Le CNR a accès à cette plateforme et plusieurs applications de ces technologies sont actuellement en développement au CNR.

Les moyens informatiques : outre le système de gestion du laboratoire (SGL) qui est utilisé pour l'ensemble des analyses traitées par le laboratoire de bactériologie (GLIMS), incluant celles du CNR, le laboratoire s'est doté d'un outil de gestion de base de données spécifiques pour les CNR sur une base du logiciel Bionumerics de la société Applied Maths hébergé sur un serveur sécurisé à la DSII des Hospices Civils de Lyon. Le Logiciel BIGSDG, permettant la gestion notamment la gestion des bases de données NGS, est en cours d'installation sur un autre serveur sécurisé à la DSII.

2.3- UN BREF DESCRIPTIF DES THEMATIQUES DE RECHERCHE DU LABORATOIRE DANS LE DOMAINE D'EXPERTISE DU CNR POUR LEQUEL IL CANDIDATE

Depuis le 1^{er} janvier 2013, le CNR est adossé à l'équipe pathogénie des légionelles dirigée par le Pr Patricia Doublet (Co-Responsable, Sophie Jarraud). Cette recherche se développe au sein du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI, <http://ciri.inserm.fr>), un centre de recherche qui regroupe 22 équipes labélisées par l'INSERM, le CNRS, l'Université Lyon1, l'Ecole Normale Supérieure de Lyon. Le CIRI est dirigé par le Dr François-Loïc Cosset et co-dirigé par F. Vandenesch.

Cette nouvelle équipe pathogénie des légionelles est le résultat de la fusion du sous groupe *Legionella* sous la responsabilité de S. Jarraud de l'équipe « Pathogénie bactérienne et Immunité Innée », dirigée jusqu'en 2013 par le Pr François Vandenesch, avec l'équipe « Mécanisme de virulence et multirésistance chez *L. pneumophila* » (UMR 5240 CNRS-Lyon1-INSA) dirigée par Patricia Doublet avec laquelle nous collaborions depuis plusieurs années. Le regroupement de ces deux équipes, situées à Lyon, avec une thématique commune mais des approches et des compétences complémentaires favorise la recherche sur *Legionella*.

L'équipe « Pathogénèse des Légionelles » est actuellement constituée de 8 chercheurs et enseignants-chercheurs, de 2 techniciens et 5 doctorants (Voir ci-dessous). Les membres du CNR des légionelles sont en grande partie membres de cette équipe. Elle a été évaluée très favorablement par l'HCERES (selon les 4 critères HCERES : 1 très bon, 3 excellent et 3 outstanding) ainsi que par la CSS7 de l'INSERM avec avis « très bonne équipe, solide » (compte rendu en annexe 5 et 6).

Les thèmes de recherche développés par l'équipe Pathogénèse des Légionelles sont en continuité avec les problématiques de santé publique couverte par le champ d'action du CNR, avec une forte composante de physiopathologie, d'épidémiologie, d'immunopathologie et de recherche translationnelle.

Composition de l'équipe Pathogénie des légionelles – équipe #5 du CIRI

PI : Patricia DOUBLET
coPI : Sophie JARRAUD

Scientists

ADER Florence* PU-PH
CHAPALAIN Annelise MCU
DESCOURS Ghislaine* AHU
DOUBLET Patricia PU
GILBERT Christophe MCU
JARRAUD Sophie* MCU-PH
KAY Elisabeth CR CNRS
VIANNEY Anne MCU

Engineers and technicians

ANDREA Claire ADT Lyon1
BAÏLO Nathalie Tech CNRS
GINEVRA Christophe* Ingénieur HCL

PhD students

ALLOMBERT Julie
LELOGEAIS Virginie
MICHARD Céline
RANC Anne Gaëlle*
VANDEWALLE Marine

* Membres du CNR des légionelles

Le projet de cette équipe a pour objectif une meilleure compréhension (1) de la virulence particulière des *Legionella pneumophila* séro groupe 1, (2) de la prédominance et l'émergence de certains clones avec des aspects relevant de l'épidémiologie et de la génétique des population en lien avec le CNR des légionelles et (3) de la sévérité et de la forte mortalité des cas de légionellose.

Concernant la virulence, l'équipe étudie les mécanismes moléculaires régulant le cycle infectieux de *L. pneumophila* en focalisant ses efforts sur les facteurs de virulence sécrétés, en particulier sur les effecteurs transloqués par le système de sécrétion de type IV (T4SS) Dot/icm. Nous étudions comment la synthèse et la translocation des effecteurs sont finement orchestrées, de manière dépendante du diGMP cyclique et par d'autres régulateurs. Nous caractérisons également le rôle de certains effecteurs Dot/Icm dans le remodelage de l'actine de l'hôte et la subversion de l'autophagie.

Concernant la sévérité de la légionellose, nos objectifs sont d'identifier des déterminants bactériens spécifiques de pathogénicité (au niveau génomique et transcritomique) et caractériser la réponse immune de l'hôte en lien avec les souche de *Legionella pneumophila*.

2.4- LES CAPACITES TECHNIQUES DU LABORATOIRE

2.4.1- liste des techniques disponibles pour le diagnostic, l'identification, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux ;

o Méthodes pour le diagnostic des légionelloses

- **Mise en culture** de prélèvements pulmonaires sur des milieux spécifiques (BCYE, BMPA, MWY)
 - Descours G, Cassier P, Forey F, Ginevra C, Etienne J, Lina G, Jarraud S. J Microbiol Methods. 2014, 98: 119-21.
- **Co-culture** des prélèvements pulmonaires sur **tapis ambien** réalisée en milieu PAS (Page's amoebic saline) ou par la technique *Amoebae Plate Test* (Test APT) nouvellement développée par le CNR et qui est la méthode utilisée depuis 2015 (paragraphe 3.2.1.2).
 - Descours G, Suet A, Ginevra C, Campese C, Slimani S, Ader F, Che D, Lina G, Jarraud S. J Clin Microbiol. 2012 Feb 8.
 - H. Hannetel, J.V. Reynaud, C. Kolenda, A.G. Ranc, L. Beraud, C. Ginevra, S. Jarraud, G. Descours. Communication orale, ESGLI 2016, Amsterdam, Pays-Bas.
- **Détection d'antigènes dans les urines** par immunochromatographie sur membrane (BinaxNOW *Legionella*®, ou autres), par immunofluorescence (Sofia®) et par ELISA (EIA Binax, ou autres).
 - Concentration des urines par centrifugation à l'aide des tubes Amikon Ultra-4 Ultracel-10k (Millipore®)
 - Chauffage des urines à 100°C pendant 5 min suivi d'une centrifugation à 1000 g pendant 15 min avant

analyse pour éliminer les faux positifs (dénaturation protéique) quelque soit le test utilisé.

- **Sérodiagnostic** par ELISA (kit commercialisé) ou par immunofluorescence indirecte à l'aide d'antigènes préparés selon la méthode de Taylor *et al.* sur sacs vitellins d'embryons de poulet (Public Health Laboratory, Colindale, UK). Des antigènes polyvalents et monovalents de l'ensemble des sérogroupes et des espèces de *Legionella* sont ainsi préparés par le CNR.
- **PCR sur prélèvements pulmonaires**, sérum, sang sur EDTA ou autres prélèvements pathologiques :
 - Utilisation du réactif Diagénode® (*Legionella* species and *Legionella pneumophila* Real-time PCR)
 - PCR universelle 16S pour les produits pathologiques provenant de sites habituellement stériles
 - PCR spécifique du séro groupe 1 de *L. pneumophila* (Lp1) applicable aux prélèvements environnementaux et aux prélèvements cliniques
 - Mérault N, Rusniok C, Jarraud S, Gomez-Valero L, Cazalet C, Maurin M, Brachet E, Aegerter P, Gaillard JL, Etienne J, Herrmann JL; the DELPH-I group, Lawrence C, Buchrieser C. Appl Environ Microbiol. 2011;77:1708-17.
 - PCR-séquencage de la région intergénique 23S-5S pour identifier les espèces de *Legionella* non *pneumophila*
 - Grattard F, Ginevra C, Riffard S, Ros A, Jarraud S, Etienne J, Pozzetto B. Microbes Infect. 2006;8:73-83.
- **Méthodes d'identification des légionelles**
- **Identification phénotypique** des sérogroupes des *L. pneumophila* par **immunofluorescence ou ELISA** à l'aide des Ac monoclonaux de Dresden (mise à disposition par Christian Lück, CNR des Légionelles, Dresden, Allemagne); agglutination de particules de latex sensibilisés à l'aide de réactifs commercialisés (Oxoid, bioMérieux); immunofluorescence directe grâce aux immun-sérums polyclonaux de lapin préparés par le CNR de toutes les espèces et sérogroupes de légionelles
 - Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. Methods Mol. Biol. 2013; 954:119-48.
- Identification génotypique des *L. non pneumophila* par **séquencage du gène mip** et comparaison de la séquence à la base de données disponible sur le site EWGLI (www.ewgli.org) et par amplification et **séquencage de l'espace intergénique 23S-5S**.
- Identification des *Legionella* par la méthode **MALDI-TOF-MS**.
Le CNR dispose actuellement de MALDI-TOF (VITEK MSTM version 2.0)
 - Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, Flaudrops C, Bedotto M, Couderc C, Etienne J, Fournier PE. J Med Microbiol. 2010;59:273-84.
 - Ginevra C, Dauwalder O, Baida N, Meugnier H, Freydiere AM, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. Communication affichée, 28^{ème} RICA 2009, Paris.
 - Dauwalder, Ottaviani R, Maffre I, Miclot A, De Respini S, Monnin V, Mailler S, Welker M, Durand G, Gaia V, Girard V, Jarraud S. Validation of the VITEK® MS IVD and RUO databases for *Legionella* species identification. Communication affichée, ESGLI Meeting, London, UK, september 2015.
- **Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques**
- Détermination des **CMI** (concentrations minimales inhibitrices) par microdilution en milieu liquide LGM
 - Vandewalle M, Massip C, Descours G, Charavit J, Chastang J, Billy PA, Boisset S, Lina G, Maurin M, Jarraud S, Ginevra C. Wild type MIC distribution of *Legionella pneumophila* isolates revealed a decreased susceptibility to macrolide correlated with the clonal distribution of efflux pump genes, soumis à AAC en 2016

- Détermination des **CMIE** (concentration extracellulaire minimale inhibant complètement la multiplication intracellulaire) après infection de lignée cellulaire macrophagique
 - Descours G, Ginevra C, Ader F, Forey F, Lina G, Etienne J, Jarraud S. Int J Antimicrob Agents. **2011** Aug;38(2):188-9.
- Détection par **PCR** en point final et en temps réel, suivies d'un **séquençage Sanger** ciblant les gènes impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones, aux macrolides et à la rifampicine : *gyrA*, *rrl*, *rplD*, *rplV* et *rpoB* respectivement) ; ces PCR peuvent être réalisées sur souche ou directement sur prélèvement
 - Descours G, Jacotin N, Forey F, Chastang J, Etienne J, Lina G, Ginevra C, Jarraud S. Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: from molecular characterization to clinical investigations. Communication affichée, 24th ECCMID, Barcelone, Espagne, 10-13 juin **2014**.
 - Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebel C, Timsit JF, Schneider D, Maurin M. Hidden selection of bacterial resistance to fluoroquinolones in vivo: the case of *Legionella pneumophila* and Humans. EBioMedicine. **2015** Jul 17;2(9):1179-85.
 - Billy P.A. Développement d'un outil de détection des sous-populations résistantes aux fluoroquinolones, aux macrolides et à la rifampicine par séquençage ciblé haut débit chez *Legionella pneumophila*. Thèse d'exercice en Médecine, sous la direction du Dr S. Jarraud et Christophe Ginevra, Octobre **2015**, Lyon
- Identification des **sous populations résistantes** aux macrolides, quinolones et rifampicine par technique de **séquençage ciblé haut débit** développée en **2015** (paragraphe 3.2.2.2) (Utilisation du séquenceur PGM).

○ **Méthode de recherche de légionelles dans l'environnement**

- **Culture** de prélèvement d'eau selon la norme NFT90-431 (Accréditation n°1-2324)
- Culture de matrice complexe tels que compost, terre, lagunes d'épuration ...
- Culture de prélèvements issus d'appareil d'oxygénothérapie
- **PCR** quantitative en temps réel selon la norme XPT90-471 : PCR quantitative détectant *L. pneumophila* et *Legionella* spp. avec un système commercialisé, le GeneCycler (GeneCycler®) (Accréditation n°1-2324)
 - Joly P, Falconnet PA, Andre J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, Maurin M, Etienne J, Jarraud S. Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation. Appl Environ Microbiol. 2006;72:2801-8.
 - Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, Andre J, Festoc G, Delabre K, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. Real-time PCR detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. Appl Environ Microbiol. 2007;73:1452-6.

○ **Détection et quantification des bactéries viables**

- Marquage de **bactéries viables** par différents marqueurs (TVC, Bac Light Kit, Dapi, Immunologique) et lecture au microscope à fluorescence
 - Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M. Appl Environ Microbiol. 2008 ;74:4817-24.
- Détection des bactéries viables par utilisation du PMA associé à une PCR
 - Slimani S, Robyns A, Jarraud S, Molmeret M, Dusserre E, Mazure C, Facon JP, Lina G, Etienne J, Ginevra C. J Microbiol Methods. 2012 Feb;88(2):319-21.

○ **Quantification de l'adhésion et de la multiplication des légionelles**

Par différentes méthodologies (microscopique, TECAN, PCR, cultivabilité) sur différents types cellulaires (U937, A549, amibes...)

2.4.2- Liste des techniques disponibles pour le typage, y compris en terme de séquençage génomique

Méthodes appliquées sur souches

- **Typage phénotypique** par ELISA ou immunofluorescence réalisé à l'aide d'un panel d'anticorps monoclonaux (mAbs) de Dresden de 24 mAbs permettant le sous-groupage des *L. pneumophila* séro groupe 1 en 9 sous-groupes (souche Philadelphia, Knoxville, Olda, Oxford, etc.)
- « *Sequence Based Typing* » (**SBT**), méthode de référence Européenne, correspondant à une amplification et à un séquençage de 7 gènes
- Analyse des profils de macrorestriction de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé (*pulsed-field gel electrophoresis* ou **PFGE**), interprétation avec BioNumerics
- Méthode de **spoligotypage** développée par le CNR permettant de discriminer les souches du clone endémique *Legionella pneumophila* Paris, technique sur membrane ou sur Luminex
 - Ginevra C, Jacotin N, Diancourt L, Guigon G, Arquilliere R, Meugnier H, Descours G, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Caro V, Jarraud S. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):696-701.
 - Gomgnimbou MK, Ginevra C, Peron-Cane C, Versapuech M, Refregier G, Jacotin N, Sola C, Jarraud S. Validation of a microbead-based format for spoligotyping of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol. 2014 Jul;52(7):2410-5.
- Identification des isolats porteurs du gène **lag-1** par PCR
- **MLVA**
- **Séquençage du génome entier** (Whole Genome Sequencing, **WGS**) applicable sur souche d'origine clinique et souche environnementale. Préparation des banques à l'aide du kit Nextera XT, séquençage paired-end 2x150pb, sur le séquenceur NextSeq (Illumina) de la plateforme des HCL.
Interprétation : analyse basée sur la cartographie des Single Nucleotide polymorphism (SNP) (Bwa et Bowtie, sous un environnement Galaxy, Parsnp) et sur le cgMLST en développement au niveau européen notamment pour le choix des gènes d'intérêt (utilisation prévue de BIGSdb en cours d'installation actuellement au CNR)

Méthodes appliquées sur prélèvement clinique ou sur échantillons environnementaux

- **Nested-SBT** : la technique de SBT peut être appliquée directement sur prélèvement clinique en s'affranchissant de l'isolement de souches. Cette méthode a été développée par le CNR. Le protocole est maintenant disponible sur le site de l'HPA (Health Public Agency).
 - Ginevra C, Lopez M, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M. J Clin Microbiol. 2009;47:981-7.

2.4.3- Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence disponibles : description (nombre de souches notamment), conditions de stockage, conditions de mise à disposition ;

2.4.3.1. Collections de souches, antigènes et immun-sérums : nombre et caractérisation

En conformité avec le décret n° 2007-1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain, l'ensemble de la collection du CNR des *Legionelles* a été déclaré sous le numéro DC-2008-176.

Collection de souches :

- souches de référence inscrites à l'ATCC soit 41 *L. pneumophila* et 56 *Legionella non pneumophila*

- souches de référence européennes du groupe EWGLI parfaitement caractérisées par différents marqueurs moléculaires (AFLP, PFGE, SBT, AP-PCR) (109 souches)
- souches d'origine clinique et environnementale caractérisées par leur identification phénotypique, leur profil en champ pulsé, leur profil en Sequence Based Typing, et pour certaines souches le séquençage complet du génome (32 980)

Collection d'antigènes produits par le CNR et utilisés pour le sérodiagnostic : 200. Ces antigènes sont produits au CNR depuis 1980. Des échantillons fabriqués il y a plusieurs dizaines d'années sont encore utilisées.

Collection d'immun-sérums produits à partir des souches de référence chez le lapin : plus de 400

Collection de sérums de patients : 25 820

Collection de prélèvements pulmonaires de patients atteints de légionellose : plus de 1100

Collection d'urines de patients atteints de légionellose : près de 250

2.4.3.2. Conditions de stockage

Collection de souches

Les collections de souches d'origine clinique et les souches de référence sont stockées à -20°C et à -80°C (2 stockages avec une surveillance des congélateurs à l'aide du système SPY avec le logiciel SIRIUS de la société JRI ; la surveillance est effectuée par 7 personnes avec un planning hebdomadaire et une surveillance quotidienne du lundi au vendredi).

Toutes les souches d'origine clinique sont conservées sans délai de temps.

Toutes les souches d'origine environnementale sont conservées pendant 3 ans puis après sélection, une partie de ces souches est conservée sans délai en prenant en compte la représentativité de toutes les espèces et sérogroupes de légionelles, la diversité géographique, la prévalence de certains clones...

Les collections d'antigènes et d'immun-sérums sont stockées à 4°C et à -20°C.

Collection de sérums

Les sérums sont conservés systématiquement depuis 2009.

Tableau 2. Collections DC-2008-176 de souches, sérums et autres prélèvements au CNR Légionelles

Collection ou stockage échantillons	Nombre approximatif d'échantillons	conditions de conservation température
sérums	25 820	-20°C
souches patients	5 550	-20°C et -80°C
souches environnementales	27 430	-20°C et -80°C
souches de référence	207	-20°C et -80°C
sérums de lapins immunisés	4 316	-20°C
Antigènes produits pour le sérodiagnostic	200	4°C et -20°C
prélèvements pulmonaires (LBA, crachats, aspirations...)	1100	-20°C
urines	250	-20°C
ADN (prélèvements pulmonaires)	1 750	-20°C

2.4.3.3. Conditions de mise à disposition

Les souches sauvages d'origine clinique et/ou environnementale de la collection du CNR ainsi que les ADN de ces souches peuvent être adressées aux laboratoires académiques, hospitaliers, ou environnementaux après demande motivée et sous le seul jugement des responsables du CNR.

Les prélèvements de patients (urines positives ou sérum positifs ou prélèvements pulmonaires) peuvent être adressés anonymisés à des laboratoires médicaux hospitaliers après demande motivée dans le contexte le plus souvent de contrôle d'une technique en cours de validation et sous le seul jugement des responsables du CNR (en conformité avec le décret n° 2007-1220 du 10 août 2007).

Ces collections sont accessibles gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition) après accord et signature de la lettre d'agrément pour le transfert du matériel du CNR des légionelles qui figure en annexe 4.

Pour les laboratoires ou sociétés privées ayant obtenu l'autorisation d'activité d'importation d'échantillons biologiques humains destinés à la recherche, la session des prélèvements anonymisés est possible selon la réglementation actuellement en vigueur et après accord et signature de la lettre d'agrément pour le transfert du matériel du CNR des légionelles qui figure en annexe 4.

2.4.4. Bases de données de séquences

Description :

Les génomes séquencés (172) sont stockés sous forme de données brutes (.fastq) et d'assemblage (.fasta). L'assemblage est réalisé en utilisant un pipeline que nous avons développé conjointement avec l'équipe « Biométrie et Biologie Evolutive », UMR CNRS 5558-LBBE Lyon 1 (Chapitre 3.4.1.4.1, figure 19).

Conditions de mise à disposition :

Les génomes publiés sont mis à disposition par soumission à ENA (PRJEB15241, PEJEB14949)

Les génomes non publiés issus de l'investigation des cas seront dans un 1^{er} temps partagés au sein du groupe de travail international NGS auquel participe le CNR (Sophie Jarraud et Christophe Ginevra) pour évaluer la méthode de typage cgMLST (voir Chapitre 7.3.5). Le « data hub » pour l'ESGLI *Legionella* data collection project' a été mis en place par le Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge, Uk. Il s'agit d'un projet cadre qui pourra contenir plusieurs sous-projets.

3. ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES (2012 - 2015)

Remerciements

Nous remercions vivement l'ensemble de nos correspondants et partenaires (laboratoires, biologistes, ARS et Délégation territoriale), notamment pour l'envoi de souches et de prélèvements pulmonaires ainsi que pour les renseignements permettant de remplir notre mission de surveillance microbiologique.

Nous remercions l'Institut de veille Sanitaire et particulièrement :

Christine Campese, Didier Che, Agnes Lepoutre, Daniel Levy-Bruhl, Catherine Maine.

Les membres du CNR des légionelles ayant participé à ces activités de 2012 à 2015 :

Responsable : Sophie Jarraud

Responsable adjoint : Gérard Lina

Biologistes : Ghislaine Descours, Laetitia Béraud, Anne Gaëlle Ranc

Ingénieur : Christophe Ginevra

Ingénieure Qualité : Maud Baume

Techniciens : Brigitte Bon, Marielle Siffert, Karine Droitcourt, Joëlle Chastang, Jérémy Reboulet, Lucie Chaverot, Nathalie Jacotin, Dominique Moret

Secrétaires : Isabelle Bregeron, Hafida Ben Hadj Ali

3.1- RESUME DES ACTIVITES (2012-2015)

Au cours des 4 dernières années (2012 – 2015), voici un résumé des faits marquants et des principales contributions du CNR.

* Une culture de prélèvements pulmonaires est positive pour environ 25 % des cas de légionellose diagnostiqués. Ce pourcentage reste insuffisant mais est en augmentation depuis 2012. Cette amélioration est une priorité pour le CNR, car elle favorisera la réalisation des investigations épidémiologiques, permettra une meilleure connaissance des clones majoritaires responsables d'infection chez l'homme, permettra une meilleure compréhension de la maladie.

* la constante augmentation du nombre d'isolats cliniques disponibles est le reflet de l'amélioration des méthodes de culture utilisées par les laboratoires et de l'envoi plus systématique des prélèvements au CNR ; le développement et la mise en place d'une nouvelle méthode de co-culture des prélèvements avec des amibes (*Amoebae Plate Test*) participent à cette augmentation.

* La PCR, incluse dans les critères de déclaration d'un cas de légionellose depuis 2011 représente, en 2015, 9% des diagnostics en France et améliore le diagnostic des cas à *Legionella non pneumophila* et des cas à *L. pneumophila* non sérotype 1.

* Ces dernières années, des rechutes ou récurrences de légionellose chez des patients correctement traités, faits qui restaient très peu décrits jusqu'alors, ont été rapportées au CNR. Un total de 10 cas cliniques de légionellose atypiques ont été caractérisés par la détection de *Legionella* dans les poumons sur une durée anormalement longue, allant de 2 mois à 1 an, avec ou sans période d'amélioration clinique ou de guérison pendant cette période. Les différentes investigations ont permis de mettre en évidence une réinfection certaine, une réinfection possible au domicile du patient et 8 cas de persistance de *Legionella* dans les poumons sur plusieurs semaines. Aucune résistance au traitement n'a pu être mise en évidence. La présence d'un abcès rendant le traitement inefficace semble être la cause de 4 infections persistantes. Le statut immunitaire particulier de 4 patients semble être à l'origine des autres infections persistantes.

* La résistance de *Legionella* aux antibiotiques jusqu'alors non décrite a été décrite à deux reprises récemment. La première description en 2013 fait état d'un isolat clinique résistant aux fluoroquinolones en lien avec un échec thérapeutique et de façon intéressante l'équipe de Max Maurin (avec laquelle nous avons collaboré) a fait la description de deux cas d'acquisition de résistance *in vivo* au cours du traitement par séquençage haut-débit réalisé sur prélèvements respiratoires. Ces données nous ont incité à développer et disposer d'outils moléculaires pour la détection de la résistance aux macrolides, fluoroquinolones et rifampicine (PCR et NGS) et à proposer une recherche de la résistance aux anti-infectieux de façon plus systématique.

* Au cours de ces dernières années, aucune épidémie (10 cas et plus) suggérant une source commune de contamination n'a été identifiée. Lors des investigations, plus de 60% des domiciles investigués semblent être à l'origine de la contamination de cas isolés. Une étude devrait être mise en place avec Santé Publique France afin de mieux caractériser le rôle du domicile comme source de contamination.

* Moins de 5% de l'ensemble des cas de légionellose déclarés chaque année fait l'objet d'une investigation microbiologique avec comparaison entre la souche clinique isolée d'un prélèvement respiratoire et une ou plusieurs souches environnementales. La stabilité du nombre de cas de légionellose diagnostiqué en France depuis de

nombreuses années malgré l'élargissement de la réglementation sur la surveillance environnementale suggère l'existence de source de contamination non surveillée et/ou non investiguée.

* Alors que plus de 2000 Sequence Type (STs) sont répertoriés dans la base de données européennes, 5 STs (ST1, 23, 37, 47 and 62) sont responsables de près de 50% des cas de légionellose. Ces données sont similaires en France. Les données phylogénétiques issues de la comparaison génomique de plus de 350 souches appartenant à ces STs et ayant une distribution internationale montrent une émergence indépendante de ces clones, une faible diversité génomique au sein de chacun de ces STs suggérant une dispersion sur de longue distance relativement rapide, fait surprenant pour une bactérie environnementale traditionnellement considérée comme un pathogène opportuniste.

* Une des révolutions majeures ces dernières années est l'utilisation du séquençage de génome complet en microbiologie. Nous avons mis progressivement en place et développé les outils bio-informatiques nécessaires pour l'utilisation du séquençage de génome complet de *Legionella* à visée épidémiologique. Les prochaines années seront consacrées au déploiement de cette méthodologie en routine pour les investigations épidémiologiques. Nous participons au groupe de travail sur le *Next-generation sequencing* (NGS) du groupe européen ECCMID Study Group of *Legionella* Infection ayant pour objectif de standardiser cette méthode de typage au niveau international.

Sur le plan analytique, l'évolution des activités du CNR est résumé dans le tableau 2.

Tableau 2. Evolution de l'activité d'expertise du CNR depuis 2012

Nombre de prélèvements ou souches	2012	2013	2014	2015
EXPERTISE				
Expertise microbiologique				
Sérologie (IF)	1410	1526	1393	1109
Culture de prélèvements cliniques	343	386	329	391
PCR sur prélèvements cliniques	104	193	236	309
Co-culture de prélèvements pulmonaires	340	304	262	252
Expertise antigènes urinaires	20	16	27	41
Identification de souches cliniques	307	323	340	346 ⁽¹⁾
Expertise souches environnementales	893 ⁽²⁾	489	458	515
Détection par culture de prélèvements d'eau complexe	2	8	11	9
Détection par PCR de prélèvements d'eau complexe	1	5	3	3
Détermination de la sensibilité aux antibiotiques (CMI)	-	-	7	5
Développement et validation de tests diagnostiques (nombre d'échantillons ou de souches testés)				
Antigènes urinaires	220	378	100	250
Milieux de culture (prélèvements pulmonaires)	330			
Identification de souches (immunologie / Maldi TOF)			60	124
Sérologie				92
PCR diagnostic (prélèvements pulmonaires)	275			
Résistances (CMI souches)	10		109	
Résistance (PCR souches et prélèvements pulmonaires)			682	
Résistance (NGS / prélèvements pulmonaires)				25
Amoebae Plate Test		20		133
Détection <i>Legionella</i> par technologie FISH	69			
SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE / ALERTE				
Participation à des enquêtes épidémiologiques environnementales	62	51	46	64
Isolats <i>Legionella</i> analysés en PFGE	835	575	480	604 ⁽³⁾
Analyse de SBT appliquée au prélèvement (Nested-SBT)	112	140	143	223 ⁽⁴⁾
Isolats <i>Legionella</i> analysés en SBT	409	401	382	429
Isolats <i>Legionella</i> analysés à l'aide de Mabs	532	581	502	584
Spoligotypage de souches Paris/ST1		41	101	

(1) Pour des raisons de cohérence avec les données de l'InVS, nous avons pris en compte les souches isolées de patients pour lesquels la date de début des signes se situe en 2015 et non les souches reçues et analysées au CNR en 2015.

(2) souches liées à l'étude sur l'évaluation du risque lié aux centrales nucléaires incluses

(3) 404 isolats cliniques (dont doublons) et 200 isolats environnementaux.

(4) 113 prélèvements étaient positifs pour au moins 1 gène.

3.2- LES ACTIVITES AU TITRE DE L'EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE (2012-2015)

3.2.1. Expertise dans le diagnostic des légionelloses

3.2.1.1- Evolution des tendances (2012-2015)

Données nationales InVS

En 2015, 1 389 cas de légionellose ont été notifiés en France. Le taux d'incidence des cas notifiés de légionellose en France métropolitaine est globalement constant depuis 2012 avec des taux autour de 2,0 / 100 000 habitants soit plus de 1300 cas par an. En 2015, ce taux était de 2,1/100 000 habitants. Le nombre de cas en 2015 est légèrement supérieur à celui de 2014 où 1 348 cas avaient été notifiés (Figure 3).

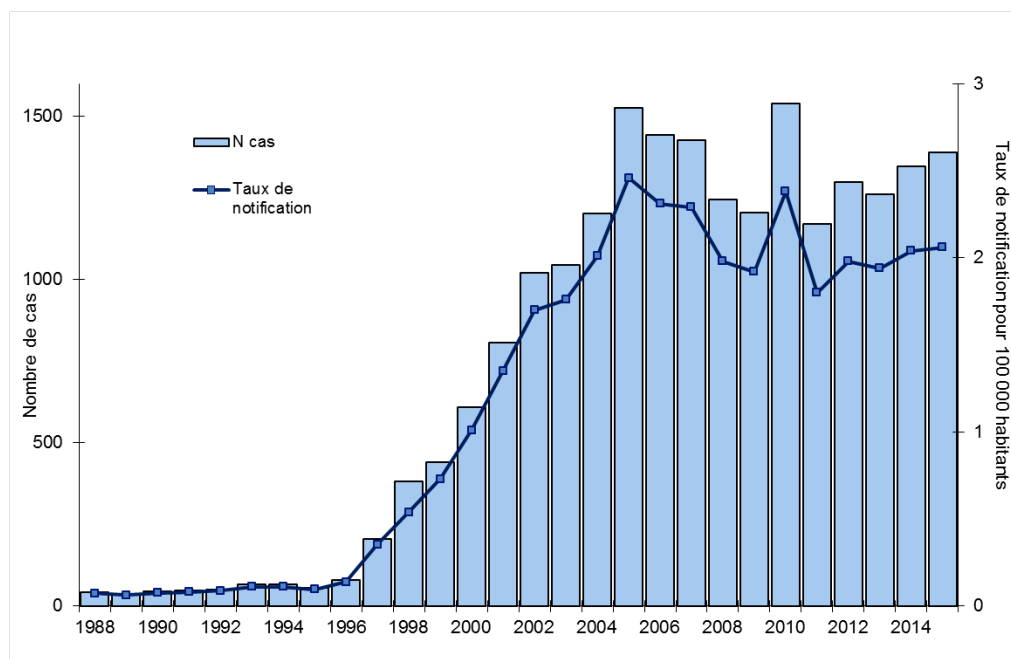


Figure 3. Evolution du taux d'incidence et du nombre de cas notifiés de légionellose en France entre 1988 et 2015 (données InVS).

Au niveau national, les données issues de la déclaration des cas sur la répartition des méthodes diagnostiques montrent la part toujours très majoritaire (~ 90%) des cas diagnostiqués par la détection des antigènes urinaires (données InVS, Figure 4). Cette répartition est similaire à ce qu'on observe en Europe. La part du diagnostic réalisé par PCR a commencé à augmenter ces deux dernières années alors que la sérologie continue de diminuer. Le faible de nombre de

cas avec un isolat disponible (moins d'un quart des cas) est à noter. Ceci reste lié conjointement à l'absence fréquente de prélèvement pulmonaire permettant la mise en culture et à la faible performance de la culture.

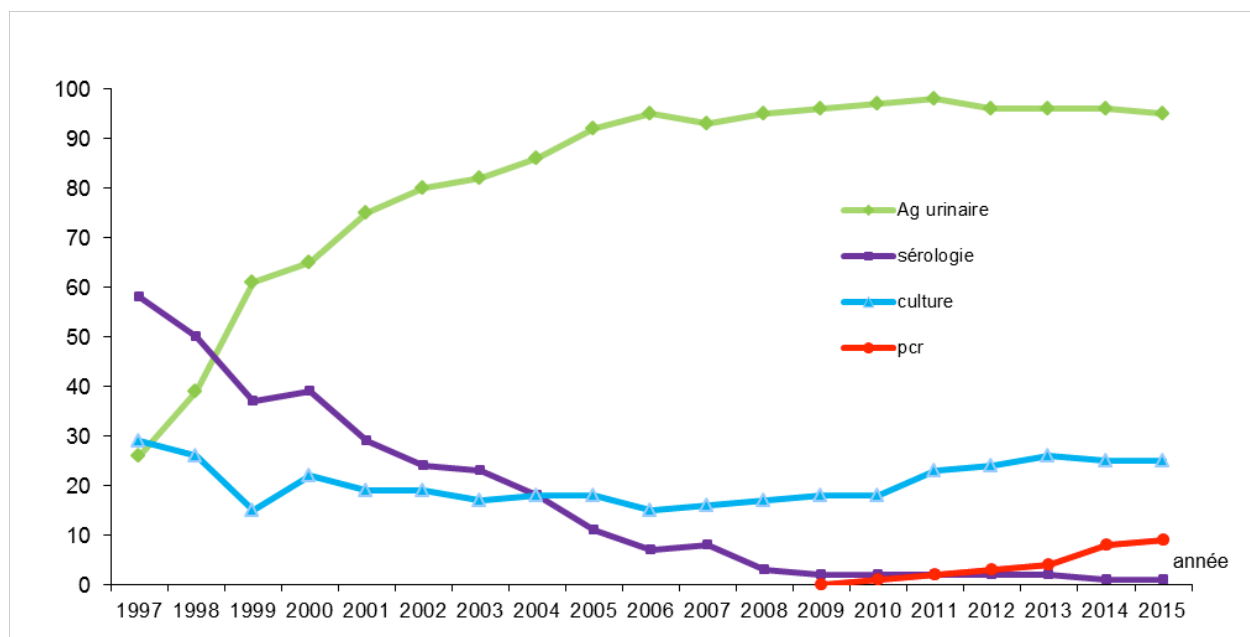


Figure 4. Répartition des méthodes diagnostiques des cas de légionelloses déclarés entre 1997 et 2015 (Données InVS).

Données CNR

Entre 2012 et 2015, le CNR a reçu 5438 sérums, 3666 souches de légionelles (dont 1311 souches d'origine clinique et 2355 d'origine environnementale) et près de 2 000 prélèvements pulmonaires (Tableau 2). On note une augmentation légère de l'ensemble des prélèvements ou souches reçues au CNR durant ces 4 années excepté pour les sérums.

En 2015, ces échantillons provenaient de près de 160 villes françaises (près de 220 hôpitaux et LABM, et plus de 50 laboratoires environnementaux) mais aussi des territoires d'outre-mer (Pointe à Pitre, Mayotte, Saint Denis de la Réunion, Saint Martin...).

* Augmentation du nombre de prélèvements pulmonaires reçus au CNR pour culture et PCR

Justification de ces envois. Nous avons, conjointement avec l'InVS et les ARS, encouragé les laboratoires à adresser les prélèvements pulmonaires au CNR en cas d'antigénurie *Legionella* positive, lorsque la culture était négative ou qu'elle n'était pas réalisée dans le laboratoire d'origine. Par ailleurs, un nombre croissant de prélèvements nous a été adressé dans un contexte de forte suspicion de légionellose malgré un antigène urinaire négatif, afin que nous réalisions une PCR *Legionella*.

La culture des prélèvements pulmonaires, bien que réalisable par les laboratoires des Centres Hospitaliers, présente une faible sensibilité. Cette sensibilité est nettement améliorée en multipliant et en diversifiant les milieux de culture ensemencés ce qui n'est pas réalisable par tous les laboratoires. De plus le CNR utilise une méthode de co-culture ambiante, améliorée en 2015-2016 (passage à une technique d'APT, *Amoebae Plate Test*) montrant de bonnes performances. Cette technique est réalisée sur les prélèvements lorsque la culture conventionnelle s'avère négative. Ainsi en 2015, cette analyse (ancienne et nouvelle technique) a été réalisée sur 39 % des prélèvements reçus et 60 cultures ont été positives. L'obtention d'isolats cliniques est la base d'une bonne surveillance de la légionellose et est un des objectifs majeurs du CNR.

En chiffre. Le nombre de mises en culture est passé de 343 en 2012 à 391 en 2015. Cette augmentation est plus sensible depuis 2010 (275 cultures). Cette mise en culture est ciblée pour les cas déjà diagnostiqués par antigénurie ou PCR. Les données de la littérature et du CNR montrent que la sensibilité de la PCR est constamment supérieure à la culture. Le nombre de demande de PCR est passé de 128 à 309 en 2015, lié à l'intégration de cette analyse dans la définition des cas de légionellose. L'évolution de ces envois est présentée en Figure 5.

Nous avons une nette augmentation de la participation des laboratoires hospitaliers depuis 2009 : en 2009 ces prélèvements nous parvenaient de 38 laboratoires hospitaliers ; en 2015, 166 laboratoires hospitaliers nous ont adressé

ce type de prélèvements.

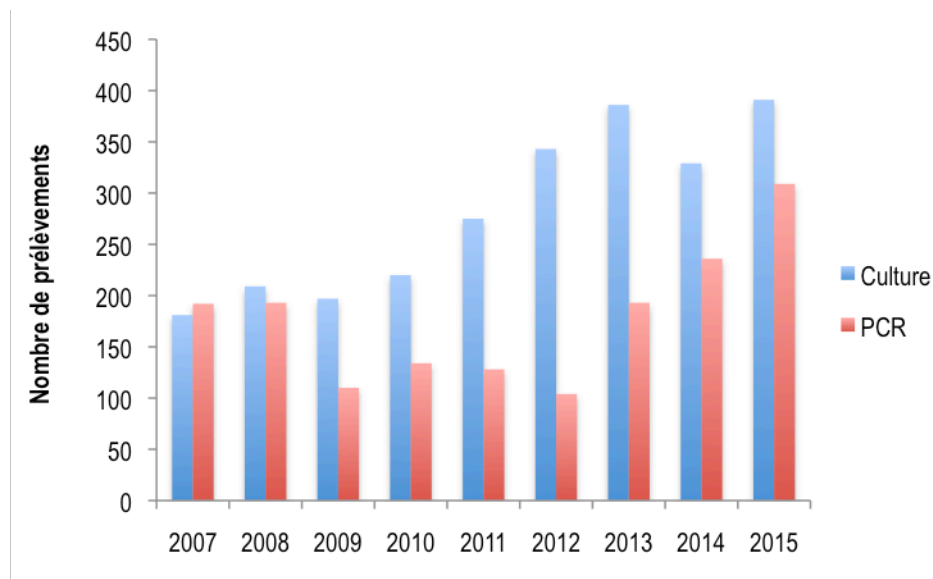


Figure 5. Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR

En 2015, sur les 303 PCR *Legionella* spp et *Legionella pneumophila* réalisées sur prélèvements, 73 (soit 24%) se sont avérées positives en *Legionella* spp dont 45 (soit 15%) en *Legionella pneumophila*. Sur les 50 PCR spécifiques *Legionella pneumophila* séro groupe 1 réalisées sur prélèvements, 13 (soit 26%) se sont révélées positives. Ces chiffres confirment l'importance de la PCR pour les *Legionella* non *pneumophila* et pour les *L. pneumophila* séro groupe non 1.

Nous avons notamment montré l'intérêt de la PCR pour le suivi adapté d'une légionellose persistante avec abcès pulmonaire malgré une antibiothérapie adaptée

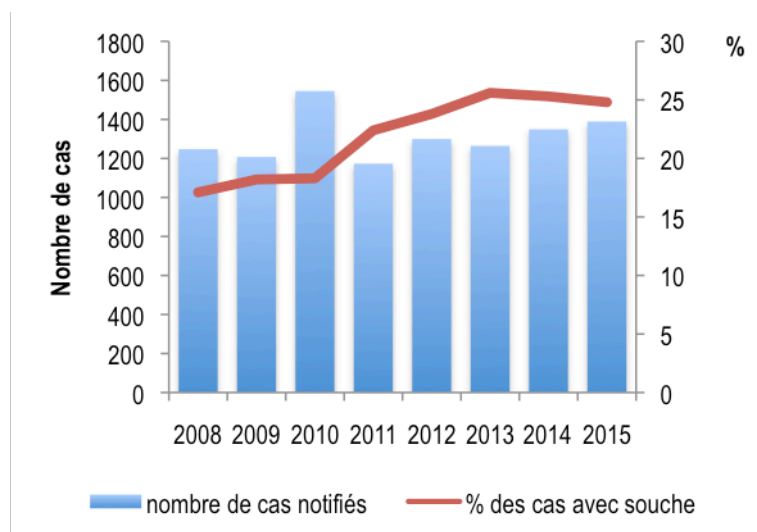
- [Descours G](#), Tellini C, Flamens C, Philit F, Celard M, [Etienne J](#), [Lina G](#), [Jarraud S](#). Legionellosis and lung abscesses: contribution of *Legionella* quantitative real-time PCR to an adapted followup. Case Rep Infect Dis. 2013;2013:190183.

* Augmentation du nombre de souches d'origine clinique expertisées par le CNR

Justification de ces envois. L'envoi des souches d'origine clinique au CNR doit être systématique (circulaire 2005).

En chiffre. Le pourcentage de cas de légionellose avec une souche isolée a augmenté de 2011 à 2013 et est stable depuis 2013 (22,5 % des cas en 2011 vs 24,9% des cas en 2015) (Figure 6).

Figure 6. Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche disponible parmi l'ensemble des cas notifiés en France (données InVS).



Les souches d'origine clinique nous parviennent de plus de 130 villes de France. Ces données sont en augmentation depuis 2012 et reflètent l'amélioration de la mise en culture pour recherche de *Legionella* en France (cf tableaux 2 à 4).

Tableau 3. Couverture géographique d'où sont issues les souches d'origine clinique

Année	Nombre de souches d'origine clinique	Nombre de villes différentes d'où sont issues les souches d'origine clinique
2007	233	103
2008	213	93
2009	224	100
2010	279	99
2011	263	115
2012	307	114
2013	323	119
2014	340	128
2015	356	133

Tableau 4. Origine des villes dans lesquelles ont été isolées les souches clinique en 2015.

Aix en Provence	1	Clamart	3	Limoges	1	Reims	3
Albi	1	Clermont-Ferrand	1	Lons le Saunier	2	Remiremont	1
Amiens	1	Colmar	4	Lunéville	2	Rennes	3
Angers	4	Colombes	4	Lyon	15	Roanne	1
Angoulême	2	Compiègne	1	Macon	1	Romans	2
Antibes	1	Creil	2	Marmande	2	Roubaix	2
Armentières	3	Créteil	8	Marseille	1	Rouen	5
Arras	2	Denain	1	Martigues	4	Saint Denis	1
Aubagne	4	Dieppe	1	Melun	1	Saint Etienne	6
Aulnay-Sous-Bois	1	Dijon	1	Metz	4	Saint Quentin	1
Aurillac	2	Draguignan	4	Monaco	1	Saint Chamond	1
Bayonne	4	Dunkerque	10	Montargis	1	Salon de Provence	2
Beauvais	1	Eaubonne	1	Montceau les Mines	2	Saumur	1
Belfort	10	Evreux	1	Montfermeil	1	Saverne	1
Besançon	10	Foix	1	Montpellier	2	Sète	3
Blois	1	Forbach	1	Mulhouse	2	St Afrique	1
Bobigny	1	Fort de France	1	Nancy	5	St Denis	1
Bondy	1	Fréjus	2	Nanterre	1	St Ouen l'Aumône	11
Bordeaux	3	Gap	1	Nantes	4	Strasbourg	12
Bourg-en-Bresse	1	Garches	1	Nevers	1	Thionville	1
Brest	3	Grenoble	4	Nice	4	Thonon les Bains	1
Brive-la-Gaillarde	2	Haguenau	3	Nîmes	1	Toulon	2
Cannes	2	Hyères	1	Niort	1	Toulouse	15
Carcassonne	1	Ivry sur Seine	1	Ollioules	1	Tours	3
Cergy Pontoise	3	Jossigny	1	Orléans	1	Valenciennes	4
Chalon-sur-Saône	4	La Roche sur Yon	2	Orsay	1	Vannes	4
Chambéry	5	La Teste de Buch	2	Paris	17	Vantoux	1
Chambray-les-Tours	1	Le Chesnay	1	Pau	1	Verdun	1
Charenton le Pont	2	Le Coudray	1	Pézenas	1	Vesoul	7
Charleville Mézières	2	Le Kremlin Bicêtre	1	Pointe a Pitre	1	Vienne	4
Chartres	4	Le Mans	7	Poitiers	2	Villefranche sur Saône	2
Chaumont	2	Le Puy en Velay	1	Pontoise	1	Villeneuve sur Lot	1
Cholet	1	Lille	1	Annecy	5	Voiron	1

En 2015 nous avons expertisé les souches de 356 patients, 213 souches ont été reçues par des laboratoires extérieurs et 143 souches ont été isolées au CNR.

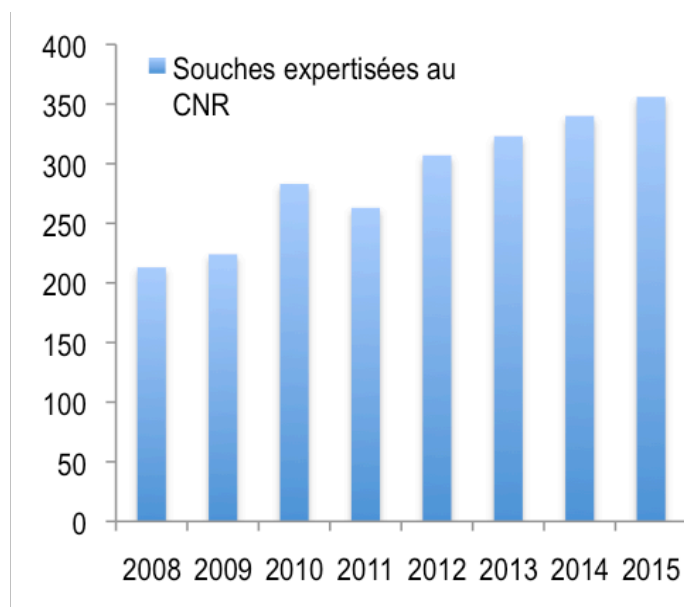


Figure 7. Nombre de souches cliniques expertisées au CNR

En Europe, 40% des isolats d'origine clinique disponibles sont isolés en France (329 / 819 isolats disponibles) (données ECDC Surveillance Report, Legionnaires' disease in Europe, 2014) ; les données de 2015 ne sont pas disponibles. Les isolats cliniques sont très majoritairement des *L. pneumophila* sérogroupe 1 (98,8% des isolats). L'espèce *Legionella* non *pneumophila* la plus fréquemment isolée est *L. longbeachae* (Tableau 5).

Tableau 5. Répartition en terme d'espèces de *Legionella* et de sérogroupe de *L. pneumophila* des souches d'origine cliniques isolées en France, 2006 – 2015.

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre d'isolements									
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
<i>Legionella pneumophila</i>	220	224	210	222	280	259	304	321	333	342
sérogroupe 1	188	218	203	211	270	248	294	305	313	328
sérogroupe 2		1		2	2		2	2	3	
sérogroupe 3	4		1	3	1	2	6	9	6	3
sérogroupe 4			1	1		4				
sérogroupe 5	1	1	2		1	2		2	1	1
sérogroupe 6	2		1	2	2		1	2	2	4
sérogroupe 7	1	2		1		2		1	2	3
sérogroupe 8	1	1	1	2	4	1	1		2	
sérogroupe 10	1								3	1
sérogroupe 14			1							
sérogroupe indéterminé*	2	1							1	2
<i>Legionella non pneumophila</i>	2	3	3	2	3	4	3	2	7	4
<i>Legionella dumoffii</i>					1		1	1		
<i>Legionella micdadei</i>	1				1	1			1	
<i>Legionella longbeachae</i>	1	1	2		1	1	1	1	5	2
<i>Legionella anisa</i>		1		1						1
<i>Legionella tucsonensis</i>										
<i>Legionella gormanii</i>			1							

<i>Legionella bozemanii</i>						2	1		1	1
<i>Legionella feelei</i>										
<i>Legionella ciniciensis</i>										
<i>Legionella wadsworthii</i>		1								
<i>Legionella sainthelensis</i>					1					
Total	222	233	213	224	283	263	307	323	340	346

* réactions croisées en immunofluorescence directe.

* Expertise des diagnostics de légionellose par anti-génurie

Justification de ces envois. La veille sur les diagnostics des cas de légionellose réalisée par la détection des antigènes urinaires est importante car 90% des diagnostics sont réalisés par cette méthode. Du fait d'une forte utilisation des tests immunochromatographiques (ICT) et de la faible incidence de la maladie (<1% des tests urinaires réalisés en France en 2010 étaient positifs), un défaut de performance des tests et notamment de spécificité pourrait entraîner une augmentation artificielle importante des cas de légionellose. Face au développement de nouveaux kits de détection des antigènes urinaires pour lesquelles les performances sont encore mal connues, les laboratoires peuvent envoyer au CNR des échantillons d'urines pour confirmation de résultats positifs. Le CNR recommande de chauffer les urines positives (5 mn, 100°C) de manière systématique pour éliminer les réactions fausses positives.

En chiffre. Ainsi, en 2015, 41 urines ont été envoyées pour investigation. Le diagnostic de légionellose a été infirmé pour seulement 2 prélèvements d'urines envoyés pour suspicion de réaction faussement positive.

Dans certains pays européens, les urines positives sont systématiquement envoyées au laboratoire de référence. Un taux de faux positif de 6% est par exemple estimé en Angleterre, pour 500 urines testées par an. Même si le CNR n'a bien sûr pas la vocation à confirmer tous les ICT positifs, la veille doit être constante.

* Diminution des sérologies

Justification de ces envois. La place de la sérologie est limitée dans le diagnostic de légionellose. Chez les patients présentant une pneumopathie compatible avec une légionellose et si la détection des antigènes dans les urines est négative, la PCR est la méthode à privilégier, associée ou non à la culture. La sérologie ne devrait être pratiquée que si la PCR ne peut être réalisée par défaut d'échantillon respiratoire ou exceptionnellement si la PCR *L. pneumophila* est positive et que l'identification du séro-groupe est important. Son principal intérêt est de détecter des réponses anticorps spécifiques pour l'ensemble des séro-groupes de *L. pneumophila* ce qui permet d'identifier le séro-groupe en cause, et potentiellement pour toutes les espèces de *Legionella*.

La sérologie *Legionella* est encore prescrite par de nombreux cliniciens. La technique ELISA est largement proposée comme méthode de criblage pour la détection des anticorps de *L. pneumophila* (le plus souvent séro-groupes 1 à 7) et montre une bonne corrélation avec les résultats de l'IFI. Néanmoins, pour être en adéquation avec les critères de définition de cas, les séro-conversions doivent être confirmées par une technique IFI. Le CNR reçoit des sérums dans ce contexte.

De plus, le CNR reçoit de nombreux sérums pour confirmation de titre obtenus par IF par le laboratoire expéditeur.

En chiffre. L'envoi des sérologies a diminué ces dernières années, 1109 sérologies ont été réalisées en 2015.

3.2.1.2- Développement et mise à disposition de techniques

En 2013-2015

- Développement et évaluation de la co-culture de prélèvements pulmonaires sur tapis d'*Acanthamoeba castellanii* par la méthode *Amoebae Plate Test (APT) (2013-2015)*

La technique d'*Amoebae Plate Test* combine les propriétés de croissance intra-amibienne et axénique de *Legionella* en une seule étape. Dans sa description initiale (Albers *et al.*, Microbiology, 2005), cette technique était utilisée pour évaluer semi-quantitativement la virulence de souches de *Legionella* pour les amibes *Acanthamoeba castellanii*.

Notre objectif a été d'adapter la technique en l'appliquant directement à des prélèvements pulmonaires afin d'isoler des légionelles.

Le principe de l'APT est le suivant :

- des amibes (*Acanthamoeba castellanii*) sont réparties sur un milieu gélosé semi-sélectif pour *Legionella* ;
- un pré-traitement de l'échantillon (lyse des cellules épithéliales et concentration bactérienne) est effectué ;
- le culot bactérien est ensemencé par spots sur le tapis amibien ;
- si elles sont présentes et viables, les légionelles infectent les amibes réparties sur la gélose ; une fois les amibes lysées sous l'effet de la multiplication bactérienne, les légionelles ont accès au milieu gélosé sur lequel elles peuvent croître et former des colonies.

Une mise au point de la technique APT sur des souches de référence et une première évaluation sur des prélèvements cliniques artificiellement surchargés par *Legionella* ont été réalisées en **2013** (stage de Camille Kolenda, Master 1 « Physiopathologie des maladies transmissibles », Université Claude Bernard, Lyon 1). Ces travaux ont permis de définir le volume des dépôts de prélèvement sous forme de spots à réaliser (3 µL), la nature de la gélose à ensemencer (BMPA) et la limite de détection de la technique (1 bactérie / µL). Comme précédemment observé avec la technique de co-culture en milieu liquide, l'APT a montré un fort pouvoir décontaminant de la flore oro-pharyngée.

Dans un second temps, **de février à septembre 2015**, nous avons réalisé une évaluation prospective de l'APT sur des prélèvements broncho-pulmonaires adressés au CNR pour mise en culture (stages de Jean-Victor Reynaud et Hélène Hannetel, étudiants en 5^{ème} année hospitalo-universitaire, ISPB, Faculté de Pharmacie de Lyon).

Nous avons analysé 133 prélèvements broncho-pulmonaires réalisés chez 123 patients présentant une légionellose confirmée (n=118) ou probable (n=15) selon les critères de la déclaration obligatoire. Pour chaque échantillon, nous avons comparé 3 techniques culturales :

- Culture axénique : inoculation de 400 µL de prélèvement sur géloses BCYE, MWY et BMPA ;
- Co-culture amibienne en milieu liquide avec *Acanthamoeba castellanii* : inoculation de 500 µL de prélèvement en plaques multi-puits, suivie d'une subculture à J3 et J7 sur géloses MWY et BMPA ;
- Co-culture amibienne par APT de 500 µL de prélèvement puis ensemencement par spots sur une gélose BMPA surchargée en amibes (*A. castellanii*).

Soixante-deux souches de *Legionella* (61 Lp1, 1 *L. anisa*) (46,6%) ont été isolées. La culture était la technique la plus sensible (42,9%), suivie par l'APT (36,1%) puis la co-culture amibienne en milieu liquide (30,1%). Sept prélèvements étaient positifs par culture uniquement, avec moins de 10 colonies (6 Lp1, 1 *L. anisa*). Quatre prélèvements étaient positifs par APT uniquement et présentaient une culture et une co-culture en milieu liquide contaminées (> 50 colonies contaminantes). Aucun prélèvement n'était positif par co-culture en milieu liquide uniquement.

Le délai d'isolement moyen des souches de *Legionella* était de 4,4 jours pour l'APT, 5,3 jours pour la culture et 7,8 jours pour la co-culture en milieu liquide.

Au total, l'APT montre de meilleures performances que la co-culture amibienne en milieu liquide en termes de sensibilité et de délai d'isolement des souches cliniques, avec l'avantage d'être une technique de coculture amibienne en une seule étape. Elle reste moins sensible que la culture axénique mais permet d'isoler des souches supplémentaires, en particulier lorsque les prélèvements sont contaminés. Elle permet donc la réalisation d'enquêtes épidémiologiques supplémentaires ainsi qu'une meilleure compréhension de la pathologie.

Les résultats de l'étude réalisée seront présentés lors d'une communication orale au 4^{ème} ESGLI meeting (Amsterdam, septembre 2016). Ils ont également été soumis pour communication orale au congrès RICAI (Paris, décembre 2016).

En 2012

- Apport des PCR spécifiques *Legionella* et/ou de la technique de nested-SBT sur les puits de co-culture amibienne dans le diagnostic et les enquêtes épidémiologiques (2012)

Depuis 2008, la co-culture amibienne de prélèvements pulmonaires était réalisée au CNR de façon routinière pour améliorer l'isolement de souches de légionelles. Un bilan réalisé sur la période 2008-2010 avait montré que l'association des techniques de culture et co-culture amibienne permettait d'obtenir un gain de sensibilité de 5% par rapport à la culture utilisée seule (Descours G *et al.*, J Clin Microbiol. 2012).

En 2012, nous avons évalué l'apport de techniques moléculaires (PCR spécifique *Legionella* et nested-SBT) lorsqu'elles étaient réalisées directement sur les puits de co-culture de prélèvements pulmonaires de patients présentant des antigènes urinaires positifs mais une culture et une co-culture négatives. Sur une trentaine de puits testés, cette stratégie n'a pas montré de gain pour le diagnostic et l'investigation épidémiologique des cas de légionellose.

Depuis, nous avons privilégié une évolution de cette technique vers la technique *Amoebae Plate Test* (APT) réalisable en un seul temps à partir de prélèvements broncho-pulmonaires.

3.2.1.3- Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Depuis 2014

Dr Kahina SOUAMI, Maitre-assistante en biologie clinique à la **Faculté de Médecine d'Alger et au Laboratoire de biologie médicale de l'Institut Pasteur d'Algérie**, a réalisé un stage au CNR en 2014 afin d'améliorer le diagnostic de légionellose à Alger puis en Algérie en diffusant les techniques de diagnostic biologique utilisées sur les prélèvements cliniques. Son objectif est également d'améliorer la détection et la quantification des légionelles dans l'environnement.

En 2015, de nombreux échanges par messagerie électronique ont permis de suivre et de conseiller sur les techniques à utiliser.

En 2016, la première *Legionella* a été isolée de prélèvement pulmonaire. Depuis 3 cas de légionellose ont été diagnostiqués. Des échantillons sont envoyés au CNR afin de valider ces cas et d'autres cas suspects.

2012

- **Transfert de techniques à l'Institut Pasteur à Casablanca** : typage des souches par PFGE, Madame M. Mekour, doctorante à l'IP Casablanca du 2 mai au 15 mai 2012.

Ce transfert de technique a permis de réaliser un travail présenté en poster à SympoLegio – Novembre 2011, Lyon : Caractérisation moléculaire et comparaison des *Legionella pneumophila* isolées au Maroc. MEKKOUR Mariam, BEN DRISS El khail, HASSAR Mohammed, SQUINAZI Fabien, JARRAUD Sophie, COHEN Nozha

- **Institut pasteur d'Alger** (Amina Benabbou) : identification des souches de légionelles et analyse PFGE.

3.2.1.4- Evaluation de méthodes, réactifs et trousse

Le CNR a réalisé l'évaluation de divers réactifs, notamment (i) des kits d'antigénurie nouvellement mis sur le marché pour évaluation de leurs performances ou des kits préexistants pour validation de certaines conditions pré-analytiques telle que la concentration des prélèvements d'urines, (ii) des kits PCR destinés aux prélèvements pulmonaires (iii) des milieux de culture pour la recherche de Légionelles dans les prélèvements respiratoires, (iv) des kits ELISA pour la réalisation des sérologies.

* Détection des antigènes urinaires

- Evaluation de méthodes

Le CNR a mis en place une méthodologie pour comparer la sensibilité des tests urinaires par l'utilisation de lipopolysaccharides (LPS) purifiés de souches de *Legionella*.

Ainsi, le CNR a comparé les limites de détection de 3 tests de détection d'antigène urinaire par l'utilisation de LPS extrait de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 à 15. Nous avons en collaboration avec le laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Equipe Microbiologie de l'eau de Poitiers (Julien Verdon et Jean-Marc Berjeaud) mis en place la purification de LPS de *Legionella*.

Le LPS de 23 souches de référence de Lp (15 souches ATCC Lp1 à Lp15 et 9 souches de chaque sous-groupe de Lp1) a été extrait de cultures pures selon une technique modifiée de Lück *et al.*, 2013. Un pool d'urines négatives a été surchargé par des concentrations déterminées de LPS (dosage du sucre interne KDO) puis ces urines diluées en série au dixième ont été testées par 3 tests de diagnostic urinaires afin de déterminer la limite de détection intrinsèque : BinaxNOW® *Legionella*, Binax® *Legionella* EIA et Sofia® *Legionella* FIA.

Pour les 15 sérogroupes, les limites de détection sont très variables en fonction du test urinaire mais peuvent être de 10 à 100 000 fois plus élevées que pour les Lp1 suivant le LPS concerné. Le test BinaxNOW® détecte seulement 3 sérogroupes alors que les tests Sofia® FIA et Binax® EIA sont capables de détecter tous les sérogroupes (sauf Lp10 pour Sofia® FIA), avec des limites de détection similaires. Le séro groupe 15 n'est détecté par aucun des 3 tests. Pour les sous-groupes de Lp1, les limites de détection sont similaires pour les trois tests, avec cependant une meilleure détection pour Sofia® FIA et Binax® EIA par rapport au test BinaxNOW® (différence d'une dilution au 1/10). Les souches

présentant l'épitope mAb3/1 ont une limite de détection légèrement plus élevée que les souches ne présentant pas cet épitope (différence entre 1/10 et 1/100).

La comparaison des tests d'antigènes urinaires est facilitée par l'utilisation de LPS extrait, et serait utile dans l'avenir pour évaluer des tests en développement. Pour les Lp1, les trois tests évalués montrent des performances similaires en terme de limite de détection. Ces différences sont plus marquées pour les sérogroupes non 1 avec des limites de détection plus élevées.

Ces travaux ont été présentés à l'ESGLI, au SympoLégio et à la RICAI en 2015.

- **Evaluations de tests de détection d'antigénurie**

* Au cours des années 2012 à 2015, différents tests rapides permettant la recherche d'antigénurie ont été évalués au CNR. Deux événements majeurs sont à noter : l'arrivée sur le marché du test Sofia *Legionella* FIA de la société Quidel qui présente la particularité d'être un test immunochromatographique avec détection des bandes par fluorescence, et le développement des lecteurs automatiques. La présence d'un lecteur de test rapide permet une traçabilité du résultat et favorise l'homogénéité de lecture des tests. Ces problématiques sont essentielles dans la démarche d'accréditation des laboratoires.

Sur l'ensemble des études, le CNR a prouvé l'importance de la concentration des prélèvements d'urines afin d'obtenir une forte sensibilité et ceci avec la plupart des tests immunochromatographiques (hors Sofia FIA) et l'importance de réaliser une confirmation des résultats positifs après chauffage de l'échantillon.

Le rôle du CNR a été de favoriser l'ajout dans les fiches techniques des fabricants les notions de concentration et de chauffage des urines. Ce point est important pour faciliter l'accréditation des laboratoires pour ces analyses dans les conditions préconisées par les distributeurs. Ces traitements pré- et post-analytiques sont globalement bien reçus par les fournisseurs, améliorant les performances des tests. Nous avons notamment préconisé le chauffage systématique des urines obtenues positives avec le test Sofia, améliorant nettement la spécificité. Cette mention est indiquée dans la fiche technique. Nous avons en cours une étude multi-centrique ayant pour but de montrer l'intérêt de la concentration des urines pour le test BinaxNOW® *Legionella*.

- Evaluation du test immunochromatographique Legionella K-Set® de la société Coris BioConcept accompagné d'un lecteur automatique

Cette évaluation débutée **en 2015** est toujours en cours en 2016. L'objectif est une évaluation à la fois du test Legionella K-Set® de la société Coris BioConcept sur urines concentrées mais également d'un prototype de lecteur automatique. Fin 2015, 200 urines négatives ont été testées en prospectifs avec le test Legionella K-Set® en comparaison au test BinaxNOW® (Alere). Aucune discordance, ni aucun problème de migration du prélèvement n'a été retrouvé. Cette étude a été présentée au congrès ESGLI 2016 à Amsterdam sous forme d'un poster.

- Evaluation de l'impact de la concentration des prélèvements d'urines sur le test immunochromatographique BinaxNOW® de la société Alere

Cette étude a débuté en avril **2015** et s'est finalisée en septembre 2016. L'objectif est une évaluation prospective de l'impact de la concentration des prélèvements d'urines sur les performances du test BinaxNOW®. Le CNR est coordinateur de cette étude à laquelle 13 laboratoires de différents centres hospitaliers de France participent. Les résultats montrent l'importance de concentrer les urines. Cette étude a été présentée au congrès ESGLI 2016 à Amsterdam sous forme d'un poster.

- Evaluation du test immunochromatographique bioNexia® de la société bioMérieux

Cette évaluation s'est réalisée en 2 étapes de **2013 à 2014**.

L'évaluation du prototype a fait l'objet d'une présentation affichée au 2nd congrès ESGLI (ESCMID Study Group for *Legionella* Infections) qui a eu lieu en septembre 2014 à Barcelone. Les performances du test bioNexia® sur urines non concentrées étaient proches de celles du test BinaxNOW® sur urines concentrées (étude sur 179 prélèvements d'urines dont 29 positives congelées). Néanmoins, la concentration de ces prélèvements apportait un gain de sensibilité supplémentaire.

Le test bioNexia® a ensuite été évalué par une étude multicentrique (3 centres dont le CNR) afin de comparer ces performances à celles des tests BinaxNOW® et Sofia FIA. Le CNR a inclus dans cette étude 100 échantillons dont 41 urines congelées provenant de patients présentant une légionellose confirmée. Les tests bioNexia® et BinaxNOW® ont été testés sur urines concentrées (UC) et urines non concentrées (UNC) alors que le test Sofia FIA n'a été réalisé que sur urines non concentrées. Tous les résultats présentés comme positifs ont été confirmés après chauffage.

Tableau : Résultats des urines avec les 3 tests évalués (bioNexia®, BinaxNOW® et SOFIA FIA)

	bioNexia® UNC	bioNexia® UC	BinaxNOW® UNC	BinaxNOW® UC	Sofia FIA
+	37	38	40	41	40
-	63	62	60	59	60

Les résultats de cette étude montrent un gain de sensibilité pour les tests bioNexia® et BinaxNOW® par la concentration des prélèvements urinaires.

- Evaluation du test immunochromatographique Sofia *Legionella* FIA de la société Quidel

Cette évaluation réalisée en **2013** était une étude multicentrique réalisée en collaboration avec le CNR Suisse (Valéria Gaïa). Ce test est accompagné d'un lecteur automatique.

Nos résultats ont fait l'objet d'une présentation affichée au congrès de la RICAI en 2013 (Paris), au SympoLegio en 2013 (Lyon), au congrès *Legionella* en 2013 (Melbourne) et à l'ECCMID en 2014 (Barcelone). Les résultats des deux centres ont fait l'objet d'une publication en 2015 dans l'European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease : « Comparison of Sofia *Legionella* FIA and BinaxNOX® *Legionella* urinary antigen caed in two national reference centers ».

Le test Sofia FIA présente une excellente sensibilité pour la détection des antigènes urinaires *Legionella* sans concentration des prélèvements d'urines. Cependant, tous les échantillons positifs doivent être retestés après chauffage pour atteindre une bonne spécificité.

- Evaluation du test immunochromatographique TRU *Legionella* de la société MERIDIAN

Cette évaluation réalisée en **2012** a fait l'objet d'une présentation affichée au congrès de la RICAI 2012 (Paris). La concentration des prélèvements d'urines s'est avérée indispensable pour obtenir une sensibilité convenable qui reste néanmoins inférieure à celle du test BinaxNOW® (36 urines retrouvées positives avec TRU *Legionella* contre 38 avec BinaxNOW®). La spécificité des 2 tests était identique après chauffage des urines positives.

- Evaluation du test immunochromatographique V-TesT *Legionella* de la société Coris

Cette évaluation a été réalisée en **2012**. Le V-TesT *Legionella* présente une sensibilité identique à celle du test BinaxNOW®, tout deux réalisés sur urines concentrées. Cependant la spécificité du V-Test *Legionella* est inférieure à celle test BinaxNOW® même après avoir refait le test sur urines chauffées.

*** PCR sur prélèvements pulmonaires**

- Evaluation du kit Legio pneumo/Cc r-gene® (Argene)

Ce kit, commercialisé par bioMérieux, permet la détection de *L. pneumophila* par PCR en temps réel (sondes Taqman) à partir de prélèvements respiratoires. Ses performances ont été évaluées en **2012**, en comparaison aux résultats obtenus avec le kit Diagénode, Dia-Lpn-050 pour la détection de *L. pneumophila*.

Un total de 275 échantillons respiratoires (principalement crachats et liquides broncho-alvéolaires) congelés et collectés dans le cadre de l'activité de routine du CNR ont été inclus dans cette étude. Parmi ces 275 échantillons, 79 ont été sélectionnés comme positifs (culture positive de *L. pneumophila*) et 196 comme « tout venant » (détection des Ag urinaires négatifs ou sélection de prélèvements en absence de demande de diagnostic de légionellose).

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

		Kit Diagénode	
		+	-
Legio pneumo/Cc r-gene®	+	79	34
	-	1	161
		80	195

Une concordance entre les résultats obtenus par ces deux kits a été observée pour seulement 240 prélèvements soit dans seulement 87,3% des cas.

Sur les 275 échantillons testés, 35 présentaient des résultats discordants :

- 34 échantillons étaient positifs avec la trousse Legio pneumo/Cc r-gene® (CT>30) mais négatifs avec le kit Diagénode. Parmi eux, 14 ont été séquencés et caractérisés comme de vrais positifs, et 20 n'ont pu l'être en

- raison d'un signal de trop faible intensité ; on ne peut exclure de faux positifs, il s'agissait de prélèvements « tout venant » dont certains pédiatriques;
- un échantillon était négatif avec le kit Legio pneumo/Cc r-gene® mais positif avec le kit Diagenode (avec un signal de faible intensité). Il n'a pas pu être séquencé pour confirmation du diagnostic.

Le kit Legio pneumo/Cc r-gene® (Argene) semble montrer de bonnes performances en terme de sensibilité pour la détection de *Legionella pneumophila*. Néanmoins, du fait du nombre important de discordance entre les deux méthodes, une vigilance particulière devra être portée sur la spécificité du kit Legio pneumo/Cc r-gene® (Argene) mais également sur la sensibilité du test Diagenode.

* Technique FISH pour le diagnostic de légionellose

- Evaluation du kit Lucesco® Pneumonia Legionella Screen, Miacom Diagnostics (2012)

L'objectif du kit Lucesco® Pneumonia Legionella Screen était de mettre en évidence *Legionella* directement à partir de prélèvements respiratoires. Ce kit utilise la technique FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) couplée à l'utilisation de sondes appelées *molecular beacons*. Lorsque les sondes marquées par une molécule fluorescente s'hybrident à l'ARN ribosomal bactérien de *Legionella* présent dans le prélèvement respiratoire, une fluorescence est émise. L'utilisation de différentes sondes devait permettre l'identification de *Legionella spp*, *Legionella pneumophila* et *Legionella longbeachae* en 30 minutes.

Dans un premier temps, nous avons évalué ce kit sous les deux versions proposées par le fabricant sur 50 souches de *Legionella pneumophila* et *L. non pneumophila* de référence ou non. Sur ces souches, le kit a montré une spécificité de 99%, avec une bonne distinction entre *Legionella pneumophila*, *L. non pneumophila* et *L. longbeachae*.

Dans un deuxième temps, notre objectif était d'évaluer ce kit sur 150 prélèvements respiratoires (crachats, aspirations bronchiques, LBA) de patients atteints et non atteints de légionellose. Les premiers résultats des 19 prélèvements respiratoires positifs en culture pour *Legionella* montraient une sensibilité insuffisante à partir des prélèvements respiratoires. Cette évaluation n'a pas donné suite. Cette technologie est commercialisée par ce fournisseur pour d'autres pathogènes.

* Sérologie

- Evaluation de techniques ELISA pour la recherche d'anticorps anti-*Legionella pneumophila* (2015)

Le CNR réalise les sérologies de confirmation demandées par les laboratoires extérieurs par technique d'immunofluorescence (IF) « maison ». De nombreuses sérologies sont réalisées par ELISA par des laboratoires comme méthode de screening.

Trois kits commerciaux permettant la recherche des anticorps anti- *Legionella pneumophila* séro groupe 1 à 6 ou 1 à 7 ont été évalués en août 2015 sur 92 sérums congelés.

Les kits évalués étaient :

- ELISA Vircell pour la recherche d'IgG et d'IgM anti- *Legionella pneumophila* séro groupe 1 à 6 ;
- SERION ELISA composé de 2 kits : un pour la recherche d'IgG anti- *Legionella pneumophila* séro groupe 1 à 7 et un pour la recherche d'IgM anti- *Legionella pneumophila* séro groupe 1 à 7 ;
- ELISA Captia TrinityBiotech pour la recherche d'IgG et d'IgM anti- *Legionella pneumophila* séro groupe 1 à 6.

Les sérums analysés étaient :

- 50 sérums considérés comme négatifs dont 25 provenant des HCL, 19 étant testés positifs par un laboratoire extérieur avec un kit commercial non renseigné, 3 sérums précoces pour des cas de légionellose, 3 sérums issus d'un patient avec une hyperéosinophilie, un patient avec une sérologie positive à *L. bozemanii* et un patient avec une sérologie positive à *Coxiella*;
- 42 sérums considérés comme positifs dont 31 avec des titres élevés en IF (≥ 256) en anticorps anti- *Legionella pneumophila* séro groupe 1 à 10 (dont 1 positif en anticorps anti- *Lp* 7-8 uniquement et 1 positif en anti- *Lp* 9-10 uniquement), et 11 prélevés au moment du diagnostic de légionellose par antigénurie ou peu de temps après pour objectiver une séroconversion.

Les résultats de spécificité entre techniques ont montré que le kit Vircell était aussi spécifique que la technique d'IF avec un seul résultat discordant sur le sérum positif en anticorps anti- *Coxiella* alors que l'IF rendait elle un résultat discordant avec le sérum du patient présentant une hyperéosinophilie. Les 2 autres techniques étaient moins spécifiques avec notamment 13 cas discordants avec le kit ELISA TrinityBiotech.

Les résultats de sensibilité ont montré une meilleure sensibilité de la technique par IF qui n'était prise en défaut que pour les cas de séroconversion précoce et qui présentait un effet zone sur un sérum ayant un titre d'anticorps anti- *Lp5* à 1024. Le kit ELISA Captia TrinityBiotech présentait également une bonne sensibilité en dehors d'un cas positif en anticorps anti-*Lp* 9-10 uniquement et de 2 effets zones. La sensibilité des 2 autres kits n'était pas satisfaisante. Au final, sur l'ensemble des sérums considérés comme positifs, l'IF était plus sensible que le kit ELISA Captia TrinityBiotech, lui-même plus sensible que les autres kits. Par contre, sur les sérums prélevés précocement au cours de l'infection, le kit ELISA Captia TrinityBiotech présentait une meilleure sensibilité que l'IF.

Les tests ELISA étant utilisés comme des tests de screening, une bonne sensibilité est requise. Le kit ELISA Captia TrinityBiotech peut donc être préconisé.

3.2.2- Expertise dans l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux

3.2.2.1- Evolution des activités

Legionella est caractérisée par une grande sensibilité aux antibiotiques couramment utilisés dans le traitement des légionelloses. Jusqu'en 2014, aucune souche clinique ou environnementale résistante aux antibiotiques n'avait été détectée. Récemment, l'isolement d'une souche clinique résistante aux fluoroquinolones (Bruin *et al.*, JAC, 2014) puis la description d'une acquisition d'une résistance *in vivo* sous antibiothérapie par NGS (Shadoud *et al.*, EBioMedicine, 2015) chez deux patients traités par fluoroquinolones nous incitent à maintenir une surveillance de la résistance aux antibiotiques chez *Legionella*.

Ces dernières années, des rechutes ou récidives de légionellose chez des patients correctement traités, faits qui restaient très peu décrits jusqu'alors, ont été rapportées au CNR (Chapitre 3.4.1.3). Ces observations motivent la demande d'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *Legionella*. Bien que les phénomènes de résistance soient exceptionnels, le CNR communique actuellement sur la possibilité de ces résistances, le but étant d'inciter l'envoi de prélèvement en cas de suspicion. Du fait d'un faible nombre de demandes, il est préférable que l'étude de la sensibilité de *Legionella* aux antibiotiques soit réalisée par le CNR.

En 2015, 5 déterminations de CMI extracellulaires ont été réalisées sur des isolats cliniques. Ce nombre de demandes a été relativement stable au cours des cinq dernières années et aucune résistance n'a été mise en évidence pour le moment au CNR.

3.2.2.2- Développements et mise à disposition de techniques

- Standardisation de la détermination des CMI en milieu liquide et détermination de la distribution des CMI de souches sauvages et résistances (2014-2015)

En l'absence de méthode de référence définie par le CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) ou l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) pour la réalisation d'un antibiogramme chez *Legionella*, le CNR a mis au point une technique d'antibiogramme par microdilution en plaques 96 puits.

Ces travaux ont été réalisés sur 109 souches cliniques, caractérisées à la fois sur la base de données cliniques (patients pour lesquels ces souches ont été isolées) et génomiques (WGS). Nous avons défini la distribution des CMI d'une population sauvage pour les antibiotiques suivants : érythromycine, clarithromycine, azithromycine, ciprofloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine, doxycycline, rifampicine.

Ces travaux ont fait l'objet du stage de fin d'étude d'IUT de Mme Joséphine Charavit, mémoire soutenu en **juin 2014**.

Ces données ont ensuite été complétées par une comparaison à des CMI de souches résistantes aux macrolides, aux fluoroquinolones et à la rifampicine sélectionnées *in vitro* dans notre laboratoire (macrolides et rifampicine) ou dans le laboratoire de Bactériologie du CHU de Grenoble (Pr M. Maurin) (fluoroquinolones).

Ces données nous ont permis de décrire la distribution des CMI de la population sensible et résistante aux antibiotiques et de définir des valeurs seuils au delà desquels une résistance doit être suspectée.

- Vandewalle M, Massip C, Descours G, Charavit J, Chastang J, Billy PA, Boisset S, Lina G, Maurin M, Jarraud S, Ginevra C. Wild type MIC distribution of *Legionella pneumophila* isolates revealed a decreased susceptibility to macrolide correlated with the clonal distribution of efflux pump genes, soumis à AAC en

- Techniques moléculaires de détection de la résistance (2012 – 2015)

Afin de s'affranchir de la nécessité de disposer d'une souche de légionelles et afin de confirmer une suspicion de résistance identifiée phénotypiquement, des méthodes moléculaires de détection de résistance aux trois familles d'antibiotiques indiquées dans les légionelloses (fluoroquinolones, macrolides, rifampicine) ont été évaluées ou développées.

- Résistance aux fluoroquinolones : PCR *gyrA* (2012)

Commencé depuis de nombreuses années, nous poursuivons un travail collaboratif avec le laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes à Grenoble (CNRS UMR5163, Institut Jean Rouget) (M. Maurin et D. Schneider) pour la caractérisation de souches de légionelles résistantes aux fluoroquinolones par PCR.

L'équipe Grenobloise a mis en évidence le fort potentiel de *L. pneumophila* à devenir résistante aux fluoroquinolones en identifiant de nouvelles mutations affectant les gènes codant l'ADN gyrase et la topoisomérase IV et en mettant en évidence un ordre bien précis d'apparition des mutations nécessaires pour l'acquisition d'un haut niveau de résistance (Almahmoud *et al.* 2009). A la suite de ce travail nous avons participé en 2012 en collaboration avec cette équipe à la mise au point un outil de détection de mutations dans le gène *gyrA* par PCR conférant la résistance aux fluoroquinolones chez *L. pneumophila* applicable sur souches et sur prélèvements.

- Résistance aux macrolides : PCR *rrl* (2012-2015)

En 1985, Dowling *et al.* ont montré la facilité avec laquelle une résistance de *Legionella* à l'érythromycine pouvait être obtenue *in vitro*. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette résistance restaient indéterminés.

De 2012 à 2013, en laboratoire L3, nous avons sélectionné *in vitro* 6 lignées de *L. pneumophila* résistantes à l'érythromycine et 7 lignées résistantes à l'azithromycine à partir de la souche ancestrale Paris, en 12 à 20 passages successifs.

Dans un premier temps, nous avons montré que :

- les mutants présentaient des CMI comprises entre 1000 et 4000 fois la CMI initiale ;
- les mutants présentaient des résistances croisées à tous les macrolides, mais ne présentaient pas de résistance croisée aux autres familles d'antibiotiques (fluoroquinolones, rifampicine, doxycycline et linézolide).

Dans un second temps, un séquençage génomique (plateforme de séquençage ProfileXpert, Lyon) a permis d'identifier les mutations présentes pour les 13 lignées. Pour toutes les lignées, nous avons observé des mutations sur les gènes codant les riboprotéines L4 et L22 et l'ARN ribosomique 23S : *rpID*, *rpIV* et *rrl* (3 copies).

Nous avons ensuite mis au point des PCR spécifiques en point final de ces 5 cibles impliquées dans la résistance de *Legionella* aux macrolides puis avons déterminé la séquence d'apparition des mutations à partir des passages intermédiaires conservés.

Les résultats montrent que :

- les mutations sur les gènes *rpID* et *rpIV* apparaissent précocement et sont associées à des résistances de bas niveau ;
- les mutations sur les gènes codant l'ARN ribosomique 23S apparaissent généralement plus tardivement et sont associées à des résistances de niveau plus élevé ;
- le niveau de résistance obtenu est corrélé à la nature de la mutation sur les gènes codant l'ARNr 23S (régions 2057-2059 et nucléotide 2611) et au nombre d'opérons mutés (1 à 3).

Dans un troisième temps, nous avons validé la corrélation entre mutations identifiées et niveau de résistance en reconstruisant des mutants à partir de la souche Paris sauvage.

En 2014, ces travaux nous ont permis de développer une PCR biplec en temps réel ciblant les deux régions des gènes *rrl* impliquées dans un haut niveau de résistance aux macrolides chez *L. pneumophila*. En cas de PCR détectant une résistance, un séquençage permet de confirmer la présence de la mutation.

Comme la PCR ciblant la résistance aux fluoroquinolones, cette PCR est applicable à la fois sur les isolats et sur les prélèvements cliniques, ce qui permet de s'affranchir de l'isolement des souches pour diagnostiquer une résistance aux macrolides. Cette PCR permet de détecter une résistance aux macrolides au sein d'une population hétérogène : présence de *Legionella* sensibles et résistantes et/ou *Legionella* possédant des copies du gène mutées et non mutées dans une proportion de 50%-50% pour la région 2057-2058-2059 et 10%-90% pour le nucléotide 2611.

Une résistance aux macrolides a été recherchée sur 537 souches et 145 prélèvements cliniques de patients atteints de légionellose. Nous n'avons pas détecté de résistance aux macrolides, ce qui suggère une faible incidence. Cette PCR reste néanmoins proposée en cas d'échec thérapeutique sous macrolide.

Ce développement a fait l'objet d'un mémoire soutenu en mai 2014 en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur du Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM) par N. Jacotin.

Ces résultats font l'objet d'un article soumis à *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* en **2016** :

Ribosomal mutations conferring macrolide resistance in *Legionella pneumophila*. G. Descours, C. Ginevra, N. Jacotin, F. Forey, J. Chastang, E. Kay, J. Etienne, G. Lina, P. Doublet, S. Jarraud

- Résistance à la rifampicine : PCR *rpoB* (2014 – 2015)

Le mécanisme de résistance de *L. pneumophila* à la rifampicine, impliquant des mutations dans le gène de la sous-unité de l'ARN polymérase N (*rpoB*) (cluster I), a été décrit dans la littérature en 2000 (Nielsen *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000).

En **2014 – 2015**, nous avons sélectionné des mutants *in vitro* et obtenu des souches présentant des CMI multipliées par un facteur de 3000. Nous avons confirmé le mécanisme affectant le gène *rpoB* par le séquençage du gène *rpoB* chez 48 mutants. Nous avons également observé des mutations jusqu'alors non identifiées, en particulier au niveau du cluster N-terminal.

Nous avons ensuite développé une PCR permettant d'amplifier la région comprenant les mutations responsable de 90% des résistances observées *in vitro* (cluster I). Cette PCR est spécifique de *L. pneumophila* et elle permet l'amplification directement à partir de prélèvement broncho-pulmonaire. Sa sensibilité est de 5 UG/µL. Les mutations sont ensuite identifiées par séquençage Sanger de l'amplicon. Cette PCR vient compléter les outils développés au laboratoire pour détecter les résistances aux fluoroquinolones et aux macrolides.

- Développement d'un outil de séquençage ciblé NGS pour la détection de la résistance aux fluoroquinolones, aux macrolides et à la rifampicine (2015)

La caractérisation *in vitro* des mécanismes moléculaires impliqués dans l'antibiorésistance chez *L. pneumophila* a permis de développer un outil NGS présentant une meilleure sensibilité que les outils précédents.

Après réalisation d'une PCR en temps réel ciblée sur les gènes mutés en cas de résistance aux trois familles thérapeutiques (*gyrA*, *rplD*, *rplV*, *rrl* et *rpoB*), un séquençage NGS est réalisé sur les produits de PCR. Il présente l'avantage de pouvoir détecter des sous-populations résistantes présentes dans une proportion de 0,5% au sein de la population totale.

Cette méthode a montré son efficacité pour détecter la sélection de mutants résistants aux fluoroquinolones au cours du traitement, décrite par l'équipe de Max Maurin (Shadoud L. *et al.* EBioMedicine. **2015**).

Nous avons développé cette méthodologie pour une détection simultanée de résistance aux fluoroquinolones, macrolides et à la rifampicine. La technique a été validée à partir des mutants obtenus *in vitro*. Vingt-cinq prélèvements respiratoires de 11 patients atteints de légionellose, choisis sur la base d'une forte charge bactérienne et d'un risque accru de présenter des mutations de résistance, ont ensuite été testés. Aucune sous-population résistante aux antibiotiques n'a été détectée.

Ce travail a fait l'objet de la mémoire d'une thèse de Biologie médicale (PA Billy) soutenue en 2015. Le projet a été financé par la Cellule Recherche & Développement du PAM Biologie et Anatomie Pathologique des Hospices Civils de Lyon

3.2.3- Rôle d'observatoire des souches atypiques

3.2.3.1- Activités

* Expertise et aide à l'identification de souches atypiques

Justification de l'envoi au CNR. Le CNR préconise que ne lui soit envoyé que (1) les souches environnementales pour lesquelles l'identification est délicate, la mise sur le marché de plusieurs réactifs permettant l'identification simple de

L. pneumophila et du séro-groupe 1 de cette espèce par agglutination de particules de latex sensibilisées facilite cette préconisation ; (2) ou les souches environnementales dont Lp1 nécessitant un typage.

En effet, plusieurs trousse commercialisées destinées essentiellement à la caractérisation de *L. pneumophila* ont été développées. Elles permettent de discriminer le séro-groupe 1 des autres séro-groupe de *L. pneumophila* par agglutination de particules de latex revêtues d'anticorps spécifiques. En France, les trousse suivantes sont disponibles :

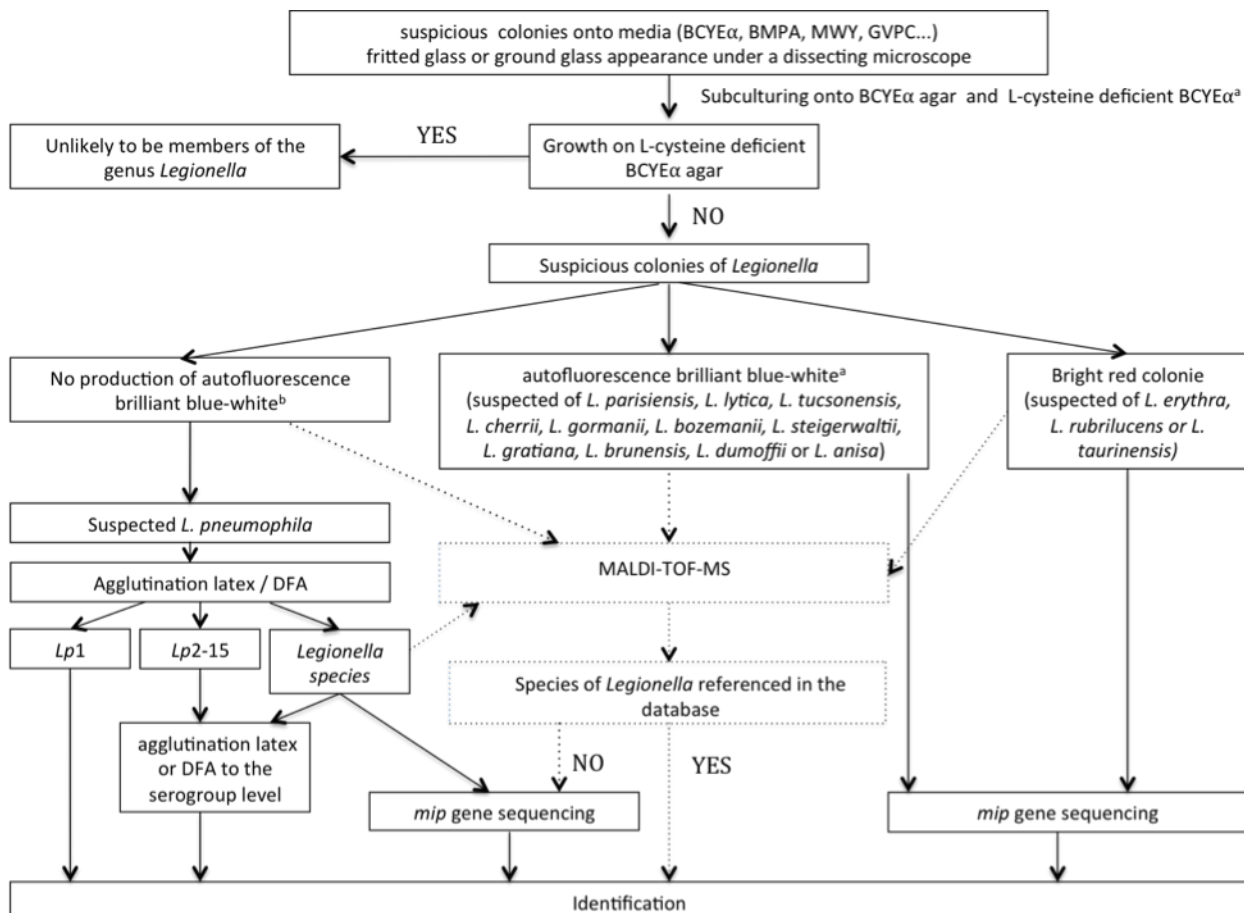
- Oxoid fournit une trousse permettant la distinction de Lp1, Lp2-14 et *Legionella* spp (*L. gormanii*, *L. longbeachae* 1 & 2, *L. bozemanii* 1 & 2, *L. dumoffii*, *L. jordanis*, *L. micdadei* et *L. anisa*) ;
- Biorad propose une trousse permettant la distinction de Lp1, Lp2-15 et *Legionella* spp (*L. feeleii*, *L. longbeachae* 1 & 2, *L. bozemanii* 1 & 2, *L. dumoffii*, *L. jordanis*, *L. micdadei* et *L. anisa*) ;

L'identification par des techniques immunologiques des séro-groupe 2-15 de *L. pneumophila* ainsi que celle des autres espèces est plus délicate. Très peu de réactifs commercialement disponibles permettent l'identification de chaque séro-groupe de *L. pneumophila* et leur utilisation est peu compatible avec les laboratoires nécessitant l'analyse de nombreuses souches. Aucun réactif ne permet l'identification du 16^{ème} séro-groupe de *L. pneumophila* (Jena-1) décrit en 1995 par Lück *et al.* Le CNR utilise des anticorps monoclonaux de Dresden qui sont mis à disposition par le CNR des Légionelles de Dresden et correspondent à la méthode immunologique de référence (Chapitre 3.2.3.2).

Les méthodes d'identification moléculaire développées pour l'identification des différentes espèces de légionelles sont basées sur la comparaison de séquences de portions de gènes ou de séquences inter-géniques (gènes *mip*, *gyrA*, *rpoB*, *mpb*, espace intergénique 23S-5S, ARNr 16S et 5S) ; les cibles ARNr 16S et *mip* sont les plus utilisées actuellement, le « gold standard » actuel étant le séquençage du gène *mip*.

Enfin, l'identification par le système MALDI-TOF MS est disponible pour tout laboratoire disposant de cette technologie. Les bases de données ont été implémentées mais toutes les espèces ne sont pas présentes dans l'ensemble des bases. De plus les évaluations de cette méthodologie réalisée au CNR montre qu'elle ne permet pas la différenciation des séro-groupe de *L. pneumophila* et que certaines espèces difficilement différenciables par les méthodes immunologiques notamment celles autofluorescentes bleues le sont parfois également par cette méthodologie.

Le schéma d'identification préconisé par le CNR est indiqué figure 8.



^aSubculturing onto either L-cysteine deficient BCYE α or 5% sheep blood agar
^bwhen irradiation with long-wave (366-nm) UV light

Figure 8. Conduite à tenir pour l'identification d'une souche *Legionella*

En chiffre. De 2012 à 2015, 2355 souches environnementales ont été envoyées au CNR (tableau 2). L'envoi est stable, le nombre important en 2012 correspondant à l'étude réalisée sur les souches isolées dans les centrales de production d'électricité françaises (voir chapitre 3.4.1.7).

En 2015, 515 souches environnementales ont été envoyées au CNR, 12% étaient des *L. non pneumophila*, 37% des *L. pneumophila* sg non 1 et 51% des Lp1 (Figures 9 et 10). La très grande majorité des souches Lp1 a été envoyée dans un objectif de typage. Pour les *L. non pneumophila*, *L. taurinensis* et *L. anisa* représentent plus de 50% des envois. Les souches *Legionella* spp. (Figure 10) correspondent à des souches en cours d'identification ou non identifiées à la demande du laboratoire d'envoi.

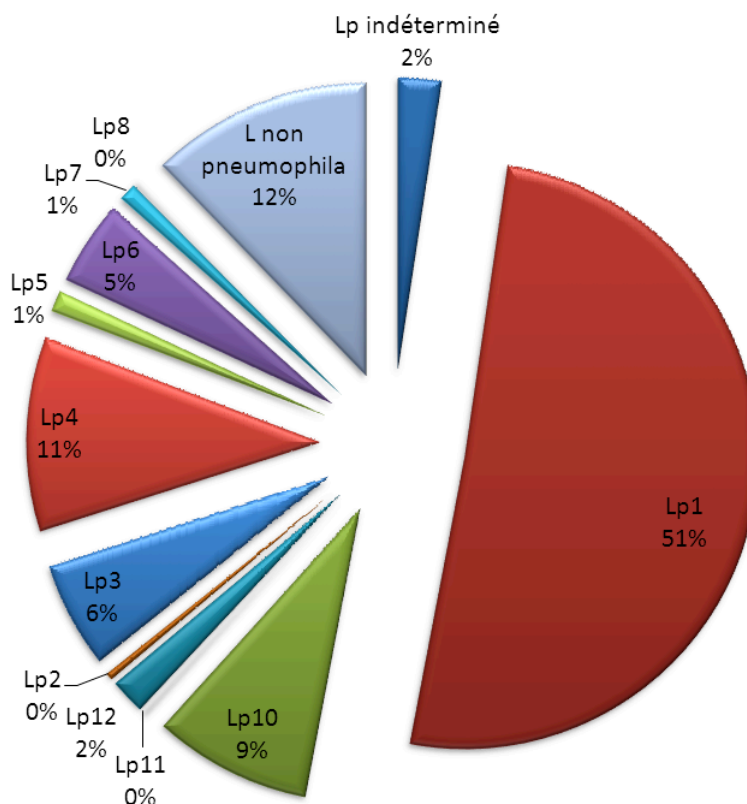


Figure 9. Distribution en terme d'espèces et de sérogroupes des souches de *L. pneumophila* et de *L. non pneumophila* d'origine environnementale reçues et expertisées au CNR en 2015.

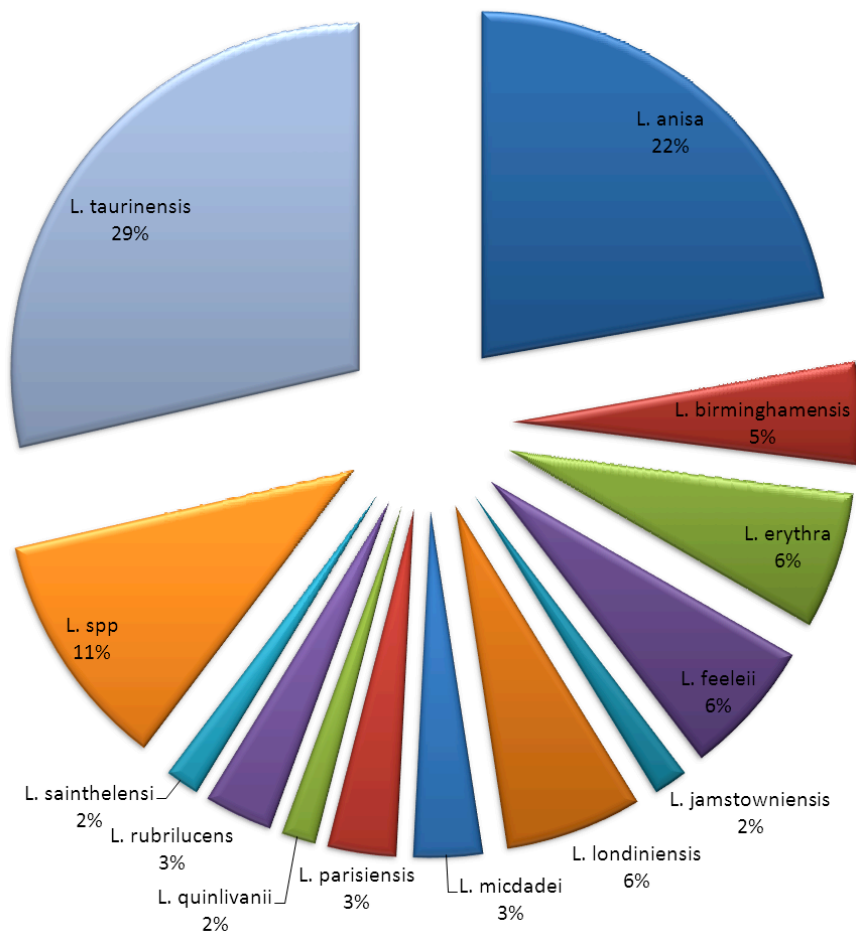


Figure 10. Distribution en terme d'espèces des souches *L.* non *pneumophila* d'origine environnementale expertisées au CNR en 2015

* Participation à l'identification de nouvelles espèces

Collaboration avec le CNR allemand pour l'identification de nouvelles espèces ;

- Une souche isolée en 2004 (HL 0431 3028) d'un échantillon environnemental a été identifiée initialement *L. hackeliae* par IF en 2004. La méthode MALDI-TOF Brucker et Shimatzu (base de données SARAMIS) testée en 2008 et 2009 respectivement n'avait pas permis son identification. Le résultat du *mip* séquençage était similaire à une souche W10-070, identifiée comme nouvelle espèce par le CNR allemand sur la base du séquençage de son génome.

La souche envoyée en Allemagne partageait un score MALDI-TOF de 1,7-1.8 avec la souche W10-070. La souche réagit également positivement avec l'antiserum fabriqué par le CNR allemand dirigé contre la souche W10-070.

W05-934-2

- une autre souche environnementale n'a pu être identifiée par *mip* séquençage et MALDI-TOF. Le 16S rRNA montre 99% d'homologie avec une souche *Legionella* sp. W05-934-2 identifiée également en Allemagne. Cette souche a été séquencée par notre laboratoire et les séquences partagées avec l'Allemagne. Le CNR allemand est en cours de description de cette nouvelle espèce sous le nom de *L. osnabrueckensis*. Le séquençage du génome de cette souche a permis de mettre en évidence des variations au niveau du gène *mip* expliquant l'absence d'amplification de ce gène par les amorces standard. Le CNR allemand a pu développer de nouvelles amorces permettant d'identifier cette souche par amplification du gène *mip*.

3.2.3.2. Evaluation de méthodes

- Utilisation d'anticorps monoclonaux pour l'identification des sérogroupes de *L. pneumophila* (2013 - 2015)

Actuellement, exceptée les méthodes phénotypiques basées sur l'utilisation d'anticorps, aucune méthode ne permet de distinguer les sérogroupes de *Legionella pneumophila*. La méthode Maldi-TOF ne permet que de distinguer *Legionella pneumophila* des autres *Legionella* et seule une PCR spécifique du séro groupe 1 de *L. pneumophila* a été développée.

De nombreuses réactions croisées sont mises en évidence entre les sérogroupes de *L. pneumophila* lors de l'utilisation d'anticorps polyclonaux (Ac du CNR ou Ac commercialisés ProLab). Nous avons validé l'utilisation au CNR des Ac monoclonaux distribués par Christian Lück (CNR Dresden, Allemagne) sur 16 souches de référence et une cinquantaine de souches sauvages. La technique d'immunofluorescence est actuellement pratiquée avec ces anticorps et ne montre pas de réactions croisées entre sérogroupes.

En 2015, nous avons évalué le transfert de cette méthode IF vers une technique ELISA. Une bonne corrélation a été montrée et une meilleure reproductibilité non lecteur dépendant pour la technique ELISA mais ceci à condition d'utiliser les anticorps sans dilution pour la technique ELISA. La durée de l'analyse étant plus longue en ELISA qu'en IF, cette méthode s'adapterait mieux à une analyse à série. Cependant, la consommation élevée d'anticorps par la technique ELISA est un facteur limitant.

- Validation externe des nouvelles bases de données MALDI-TOF MS systems VITEK® MS IVD and RUO SARAMIS de bioMérieux (2014)

En 2009, nous avons évalué les deux systèmes actuellement disponibles sur le marché (Bruker et Shimadzu) chacun couplé à une base de données (Bruker et Anagnostec/BioMérieux, respectivement).

- Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, Flaudrops C, Bedotto M, Couderc C, Etienne J, Fournier PE. Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry. J Med Microbiol. 2010;59:273-84.
- Ginevra C, Dauwalder O, Baida N, Meugnier H, Freydiere AM, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. Évaluation du spectromètre de masse AXIMA SARAMIS SIRWEB-MALDI-TOF pour l'identification d'espèce des légionelles par MALDI-TOF-MS. Communication affichée, 28^{ème} RICA 2009, Paris.

En 2014, afin d'améliorer les performances pour l'identification des légionelles, la base de données SARAMIS a fait l'objet d'une mise à jour notamment en partenariat avec le laboratoire de référence de Suisse (Valeria Gaia). Dans ce contexte, bioMérieux a contacté le CNR des Légionelles pour réaliser une validation externe de cette mise à jour.

Méthode. Les analyses ont porté sur 124 souches de *Legionella non pneumophila* (comprenant 16 espèces déjà impliquées en pathologie humaine) et 20 *Legionella pneumophila*, provenant toutes de la collection du CNR.

Resultats. Le pourcentage global d'identification correcte au niveau de l'espèce était de 92% et 94,8% respectivement pour les bases de données IVD et RUO. Pour le mode RUO, à l'exception des espèces *L. gormanii*, *L. feelei* et *L. micdadei* qui peuvent être identifiées au niveau de l'espèce dans 40%, 92,3% et 95,5 % des cas, toutes les autres espèces étudiées étaient correctement identifiées. Les résultats du mode IVD étaient similaires. Cependant 9 mauvaises identifications étaient obtenues avec la base de données IVD contre 4 avec la base de données RUO.

Ce travail réalisé en collaboration avec le CNR Suisse a été présenté en poster au congrès européen ESGLI 2015.

3.2.4- Expertise dans la détection des légionelles de l'environnement

Sur le plan environnemental, en dehors des laboratoires environnementaux qui nous envoient des souches pour identification ou typage, nos partenaires comprennent notamment le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie, Direction générale de la prévention des risques (DGPR), l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), l'Agence Française de Normalisation (AFNOR), des laboratoires environnementaux (par exemple le Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris (Damien Carlier), l'Institut Pasteur de Lille (Olivier Molinier), le laboratoire Carso de Lyon (Cindy Schur)), des fournisseurs de kits (BioRad, PallGeneSystems, Aquatools, BioMérieux, Oxoid...).

3.2.4.1- Développement et mise à disposition de technique

Le CNR assure depuis 2009 la distribution de l'étalon primaire d'ADN pour la détection de *Legionella* par PCR quantitative dans les prélèvements environnementaux. Parallèlement à l'étalon de référence, il a été décidé de distribuer également un contrôle quantitatif externe (CQE) pour compléter la chaîne d'étalonnage.

Deux articles scientifiques ont été publiés en 2013 pour décrire la méthode de certification utilisée et le déroulement de la certification ainsi que la comparaison avec une autre méthodologie de dosage ADN.

- Leclerc O, Fraisse PO, Labarraque G, Oster C, Pichaut JP, Baume M, Jarraud S, Fiscaro P, Vaslin-Reimann S. Method development for genomic *Legionella pneumophila* DNA quantification by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Biochem* 2013;435:153-8.
- Baume M, Garrelly L, Facon JP, Bouton S, Fraisse PO, Yardin C, Reyrolle M, Jarraud S. The characterization and certification of a quantitative reference material for *Legionella* detection and quantification by qPCR. *J Appl Microbiol* 2013. Jun;114(6):1725-33.

Les deux lots d'ADN ont été soumis à des études de stabilité et des échantillons sont régulièrement testés pour s'assurer de leur qualité. Un système de surveillance informatisé est en place pour s'assurer des bonnes conditions de stockage. Le site Internet mis en place, accessible depuis la page d'accueil du site du CNR (<http://cnr.univ-lyon1.fr>), est régulièrement mis à jour et permet aux laboratoires demandeurs de s'informer sur les produits disponibles.

Depuis 2009, 232 ADN étalon et 152 CQE ont été envoyés directement à 37 laboratoires français et 15 laboratoires étrangers (Allemagne, Belgique, Canada, Danemark, Espagne, Irlande, Pays Bas, Royaume Uni et Slovénie). De plus, 73 ADN étalon et 30 CQE ont été distribués par le distributeur spécialisé LGC Standard, avec lequel nous avons une convention, uniquement dans des laboratoires à l'étranger (Figure 11). L'augmentation observée en 2015 provient des ventes plus importantes par le distributeur LGC Standard.

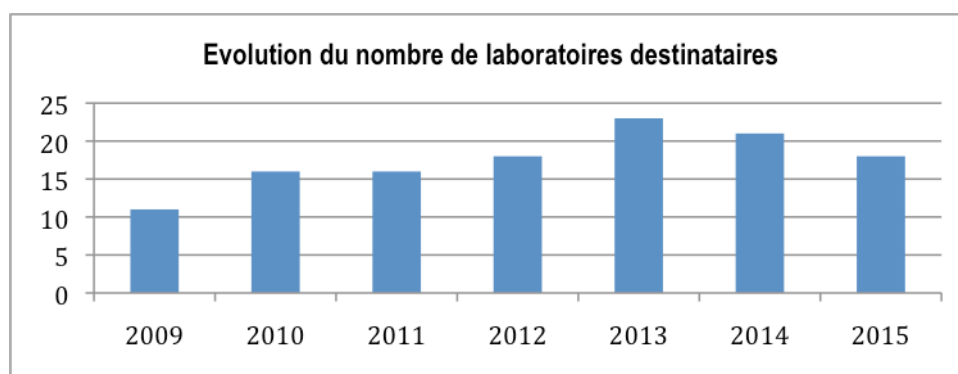
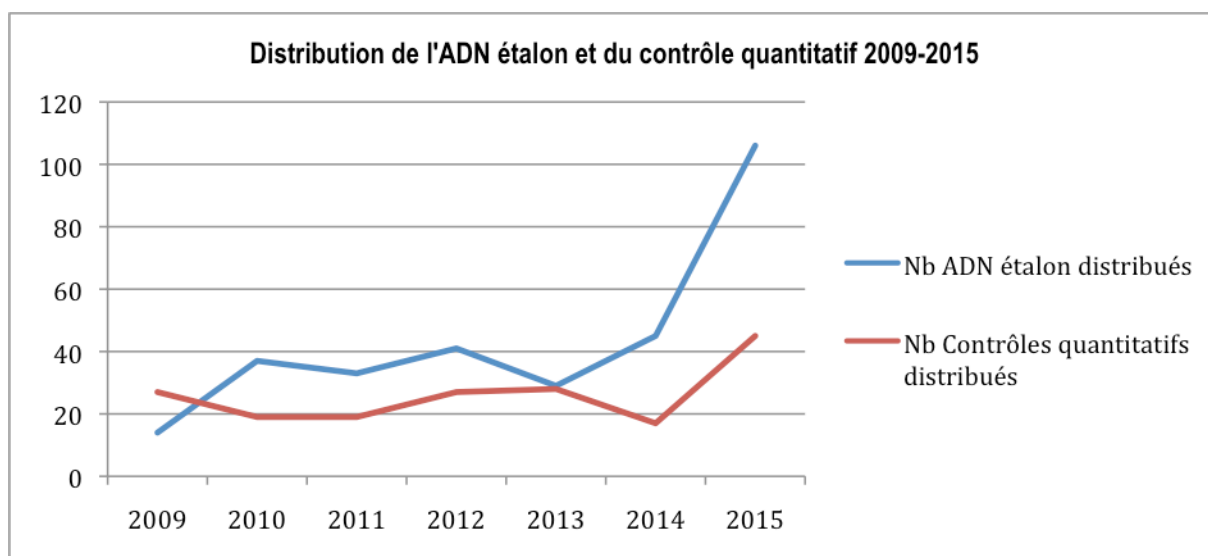


Figure 11. Distribution et évolution de la distribution de l'ADN étalon en nombre de laboratoires demandeurs depuis 2009.

3.2.4.2- Evaluation de méthodes ou réactifs

Evaluation d'une puce (développée par la société Dendris) pour l'identification d'espèces de *Legionella* au sein d'un environnement hydrique (2012). La DendrisChip Legio utilise la technologie des puces à ADN grâce à l'utilisation d'une chimie particulière brevetée, les dendrimères. Cette puce a été développée pour détecter et identifier 21 espèces de *Legionella* isolées chez l'homme grâce à des sondes oligonucléotides spécifiques greffées sur une lame de verre. L'objectif était de pouvoir identifier la diversité des espèces de légionelles présente dans un échantillon. La spécificité de cette puce a été testée par l'industriel sur des souches ATCC. L'objectif du CNR était l'évaluation de cette puce sur 200 souches environnementales appartenant ou non à ces espèces cibles puis ensuite des des échantillons d'eau. Des problèmes de spécificité sont apparus avec l'étude des souches conduisant à interrompre cette évaluation.

3.2.4.3- Activités d'expertise

De nombreux laboratoires environnementaux performants et accrédités réalisent la recherche de légionelles dans l'eau par culture selon la méthode normalisée NFT90 431. Le rôle du CNR n'est pas de se substituer à eux. Nous avons donc volontairement centré nos activités et notre expertise sur la détection des légionelles d'environnement complexe non soumis à accréditation.

Accréditation du laboratoire pour la détection des légionelles dans l'eau

Afin de conserver une expertise pour la recherche de légionelles par culture et PCR, le laboratoire de bactériologie réalise la détection de légionelles pour l'ensemble des hôpitaux des Hospices Civils de Lyon (HCL). Cette activité ne fait pas partie du bilan d'activité du CNR. Elle est réalisée par les techniciens du CNR mais sur une partie de leur ETP non reportée sur le CNR. Le laboratoire est accrédité pour ces deux méthodes (n° accréditation 1-2423). Cette activité comprend les eaux chaudes sanitaires, les eaux froides ou mitigées et les eaux des fauteuils dentaires. En 2015, 824 prélèvements d'eaux ont été analysés par culture (+28% par rapport à 2014) et 905 souches de *Legionella* ont été isolées et identifiées. Du fait d'un arrêt temporaire en 2014, 47 échantillons d'eau ont été analysés par PCR. Ces analyses ont également pour intérêt pour le CNR de disposer de souches isolées et caractérisées dans les mêmes centres hospitalier depuis de nombreuses années.

Expertise du CNR dans la détection de légionelles dans des environnements non soumis à l'accréditation, en particulier dans les environnements complexes

- a. Analyse des eaux des appareils à pression positive, appareils d'oxygénothérapie, humidificateurs

Les appareils d'oxygénothérapie comme les appareils de ventilation à pression positive continue (traitement de l'apnée du sommeil), ainsi que les appareils d'aérosolthérapie et les humidificateurs, sont rincés ou remplis avec de l'eau normalement stérile. Des préconisations de l'ANSM ont été récemment formulées en 2016 <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Dispositifs-medicaux-d-assistance-respiratoire-utilises-a-domicile-Recommandations-destinees-aux-patients-Point-d-Information>. Un mésusage courant est d'effectuer ce remplissage avec de l'eau du robinet. La littérature resence plusieurs cas d'infections à *Legionella* pour lesquelles ce type d'appareil est suspecté comme être la source de contamination. La recherche de *Legionella* dans l'eau des appareils d'oxygénothérapie et d'aérosolthérapie est difficile à réaliser. En effet, l'eau est soit jetée après rinçage, soit utilisée par l'appareil ce qui ne laisse que rarement un volume suffisant pour réaliser l'analyse.

Le CNR a proposé des recommandations pour la réalisation des prélèvements adressés lors de l'investigation des cas. L'eau restante ou les résidus de produits (aérosolthérapie) dans le réservoir du dispositif constitue le meilleur échantillon mais malheureusement rarement disponible. L'ensemble du dispositif amovible si possible peut être réquisitionné : le réservoir, la tubulure, le masque, les embouts nasals : un écouvillonnage de différentes tubulures pour mise en culture ou un rinçage de l'appareil avec un faible volume d'eau stérile pour PCR et mise en culture. Les sensibilités de ces méthodes sont malheureusement faibles. Enfin, l'eau utilisée pour remplir le réservoir (eau du robinet, eau embouteillée, eau stérile...) doit être prélevée.

Entre 2011 et 2015, 16 appareils d'aérosolthérapie/oxygénothérapie issus de 16 investigations différentes ont été analysés par le CNR pour recherche de *Legionella*. Le CNR a reçu un volume d'eau (soit l'eau restante dans l'appareil,

soit de l'eau de rinçage) dans 15 cas. Des écouvillons réalisés sur différentes tubulures, sur le masque ou au fond de la cuve ont été réalisés pour 6 des 16 cas. La recherche de *Legionella* a été réalisée par culture pour 14 des cas et par PCR pour 9 des cas. Le tableau ci-dessous reprend les analyses effectuées pour chaque appareil exploré.

Tableau 6. Recherche de *Legionella* dans les appareils d'oxygénothérapie ou d'aérosolthérapie de 2011 à 2015

Date	Origine	type d'appareil	mode prélèvement	nombre de prélèvements	analyse par PCR	analyse par culture
oct-15	Strasbourg	appareil d'apnée du sommeil	eau	1	x	
déc-14	St Flour	appareil d'apnée du sommeil	écouvillon	1		x
août-14	Belley	appareil d'aérosolthérapie	écouvillon	4		x
			eau	1	x	x
juin-14	Haguenau	non précisé	eau	1	x	
mars-14	Clinique le Verdon	non précisé	écouvillon	1		x
			eau	2		x
avr-14	Marseille	appareil d'apnée du sommeil	eau	1	x	x
janv-14	Paris, Hopital St Louis	non précisé	eau	1		x
déc-13	Marseille	appareil d'apnée du sommeil	eau	1		x
juin-13	Angers	appareil d'oxygénothérapie	eau	2	x	x
			écouvillon	1		x
janv-13	Chalon sur Soane	appareil d'apnée du sommeil	eau	1		x
juil-13	Rodez	appareil d'oxygénothérapie	eau	1	x	x
oct-12	Belfort	appareil d'apnée du sommeil	eau	1		x
juin-12	CH Saverne	non précisé	eau	1	x	x
juil-11	Rennes	humidificateur	écouvillon	1		x
			eau	1		x
oct-11	CH Sens	non précisé	eau + écouvillon	3	x	x
nov-11	Villerbanne	non précisé	eau	1	x	x

Aucune souche de *Legionella* n'a pu être isolée au cours de ces explorations. Les faibles volumes d'eau analysés (seulement 4 à 200 mL) et la présence de flore interférente importante (2 cas) peuvent être des explications à ces échecs.

En PCR, sur les 9 appareils investigués, 5 appareils se sont révélés positifs en PCR, 3 à *Legionella spp.* seuls, et 2 appareils d'apnée du sommeil à *L. pneumophila* séro groupe 1. Pour l'un d'entre eux, la technique de Nested-SBT n'a pas permis d'identifier le *Sequence Type* (ST). Pour l'autre échantillon, la technique de Nested-SBT a permis d'identifier une Lp1 ST 36. La souche isolée du patient a été caractérisée comme étant une Lp1 ST1 ne permettant pas de confirmer ce dispositif comme source de contamination.

Tableau 7. Bilans des 5 eaux issus d'appareils d'oxygénothérapie/aérosolthérapie positifs à *Legionella* en PCR

Date	Origine	Type d'appareil	mode de prélèvement	volume (L)	Legionella. spp	L. pneumophila	PCR Lp1	N-SBT
------	---------	-----------------	---------------------	------------	-----------------	----------------	---------	-------

					UG/L	UG/L		
oct-15	Strasbourg	appareil d'apnée du sommeil	eau	0,08	680000	<12000	positif	négatif
août-14	Belley	appareil d'aérosolthérapie	4 écouvillons					
			eau	0,17	3000000	négatif		
juin-13	Angers	appareil d'oxygénothérapie	eau	0,005	5900	négatif		
			écouvillon					
oct-11	CH Sens	non précisé	3 eaux de rinçage	0,2	3700000 (1 seule des 3 eaux) - négatif pour les 2 autres	négatif		
avr-14	Marseille	appareil d'apnée du sommeil	eau	0,03	< 31 000	< 31 000	positif	ST 36

b. Analyse des eaux d'endoscope

Suite à un cas de légionellose diagnostiqué en mars 2015, le CNR a analysé par PCR 2 filtres sur lesquels avait été concentrés l'eau de lavage d'un endoscope. En effet, l'enquête environnementale avait révélée 2 sources de contamination possible : l'eau du domicile du patient et l'endoscope de l'hôpital. Les PCR *Legionella* spp, *Legionella pneumophila* et Lp1 réalisées sur l'extrait d'ADN obtenu à partir d'un des filtres étaient positives, confirmant la présence de Lp1 dans l'eau d'endoscope. Les PCR de typage directement à partir de ce même extrait n'ont pas permis d'obtenir le ST de la souche environnementale mais 2 gènes sur 7 ont pu être identifiés. Au final, une souche clinique avait pu être isolée d'un lavage broncho-alvéolaire réalisé en mars 2015. Cette souche a été comparée à une souche environnementale isolée de prélèvements d'eaux réalisés au domicile du patient et aux gènes identifiés dans l'eau d'endoscope. Aucun des prélèvements environnementaux ne contenait une souche compatible avec la souche clinique. La source de contamination n'a donc pas pu être déterminée. Néanmoins ce cas prouve la présence de *Legionella* dans l'eau de rinçage des endoscopes, ce qui peut être une source de contamination.

c. Analyse de terre et de terreaux

Les terres et terreaux sont susceptibles d'être contaminées par *Legionella* spp. et peuvent être une source d'infection. Cet environnement est notamment le réservoir de *L. longbeachae*. Le CNR propose pour certains cas une méthode d'analyse par PCR et/ou culture des terres et terreaux.

En 2012, suite à un cas d'infection à *L. longbeachae* chez un patient pratiquant le jardinage, nous avons analysé par culture et PCR un prélèvement provenant du sac de terreaux utilisé par le patient, un prélèvement d'un pot de fleurs et un prélèvement du parterre de fleurs extérieurs. Le prélèvement de terreaux était positif en PCR à *L. spp* et *L. pneumophila*. En culture, une souche de *L. pneumophila* séro groupe 12 a été isolée. Le prélèvement de pot de fleur était négatif en PCR et culture. Enfin, le prélèvement de parterre de fleurs était positif en PCR à *L. spp* et négatif à *L. pneumophila*. Malheureusement, aucune souche n'a été isolée de ce prélèvement. Le parterre de fleurs et le terreaux positif à *L. spp* pourrait être la source de l'infection mais en l'absence de souche environnementale isolée, ceci ne peut pas être affirmé.

En 2014, prélèvement de 4 **composts industriels** exposé en plein air dans la zone d'Aurillac Sud, suspecté en lien avec l'augmentation du nombre de cas depuis 2008 dans la région d'Aurillac ; les cultures se sont révélées négatives.

En 2015, analyse de prélèvements de l'eau de rejet du système de refroidissement, sols et sédiments adjacents à une centrale nucléaire afin de vérifier une éventuelle contamination (Institut des Sciences de l'Environnement de l'Université de Genève). Les prélèvements reçus étaient négatifs en culture de *L. pneumophila* et *Legionella spp.* Les PCR réalisées en Suisse montraient des PCR positive en *Legionella spp.* pour les échantillons d'eau et sédiments secs et négatifs pour la PCR *L. pneumophila*.

3.2.5- Souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués

En 2011 :

- ADN des souches *Legionella spiritensis* et *Legionella rowbothami* et souches *L. santicrucis*, *L. bozemanii* séro groupe 1, *L. gormanii*, *L. maceachernii*, *L. busanensis* : Institut Pasteur Paris, Carmen Buchrieser
- ADN de 7 souches de référence de *L. pneumophila* à Mme Colinon et Mr Cournoyer, Equipe BPOE - UMR 5557
- ADN de 26 souches de référence de *L. non pneumophila* au Professeur Max Maurin, Grenoble
- ADN de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 Paris CIP 107-629-T à Sandrine BAYLE, Ecole des Mines d'Alès
- 4 souches, 3 *L. pneumophila* et 1 *L. taurinensis* à Danièle Atlan (UMR 5240 CNRS - Université Lyon 1- INSA – BayerCropScience)

En 2012 :

78 souches issues de la souchothèque CNR ont été distribuées :

- Société BioMérieux : 25 souches *L. pneumophila* et 6 souches *L. non pneumophila*
- Laboratoire Hygiène de la Ville de Paris (LHVP) et Groupe de Travail Afnor : 1 souche Lp5 et *L. anisa*
- 47 *Legionella pneumophila* et non *pneumophila* pour séquençage (Institut Pasteur de Paris, Carmen Buchrieser)
- Dominique Schneider (Université Grenoble) : 1 souche Lp1 Paris
- HPA Londres : 3 Lp1 (ayant un allèle *mip* particulier : *mip* 11, *mip* 39 et *mip* 55)

ADN

- 10 ADN *Legionella non pneumophila* au laboratoire LERES, Nîmes
- 13 ADN à la Société DENDRIS

En 2013 :

- 5 souches sauvages *L. pneumophila* sg 6 et 5 souches sauvages *L. pneumophila* sg 7, Sam Dukan, CNRS UMR 7283, Laboratoire de Chimie Bactérienne, MARSEILLE
- souche *Legionella pneumophila* séro groupe 1 de référence Paris, Madame Iris GUILLOCHIN, Laboratoire SOCSA Analyse, 31 L'UNION
- 3 souches *Legionella fallonii*, 2 souches *Legionella hackeliae*, 4 souches *Legionella pneumophila* de sg9, sg11, sg13 et sg indéterminé (14-15-9) Carmen Buchrieser, Institut Pasteur, PARIS
- 15 souches *L. pneumophila* séro groupe 1 à 15, Olivier Challemel Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris, PARIS
- 1 souche *L. pneumophila* séro groupe 1 Lens, Dr. Cagla BOZKURT-GUZEL, Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Dept of Pharmaceutical Microbiology Beyazit, Istanbul, TURQUIE
- 3 échantillons de 1 mL d'urines avec détection positive d'antigènes urinaires *Legionella*, Pr. Marie-Hélène NICOLAS-CHANOINE, Service de Microbiologie, Hôpital Beaujon, 92110 CLICHY
- 11 souches *L. pneumophila* séro groupes 2, 4 et de 7 à 15, Julien Verdon Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions UMR CNRS 7267, Equipe Microbiologie de l'Eau, Université de Poitiers, 40 avenue du Recteur Pineau, F-86022 POITIERS

En 2014 :

- ADN de *L. pneumophila* séro groupe 1 Paris, Rita Rocha, Structural Biochemistry Group, IBMC - Institute for Molecular and Cell Biology, Porto, Portugal.

- 5 isolats de ST345 envoyés à Christian Lück au centre de référence national allemand (ST responsable de l'épidémie en Allemagne en 2014).
- 3 ADN d'isolats ST109 et 10 ADN d'isolats ST47 envoyés à Tim Harrison au PHE de Londres dans le cadre de notre collaboration sur la mise au point d'une PCR spécifique du clone ST47.
- ADN génomique de 30 isolats ST1, 30 isolats ST47, 30 isolats ST23 et 6 isolats de ST proches du ST23 envoyés à Carmen Buchrieser à l'institut Pasteur de Paris.
- 4 prélèvements d'urines à bioMérieux pour évaluation de leur réactif bioNexia®. Ces échantillons recueillis chez des patients présentant une légionellose confirmée étaient positifs avec le test BinaxNOW® *Legionella* (Alere) et Sofia FIA (Quidel).
- ADN à Christophe Sola (Infection Genetics Emerging Pathogens Evolution (IGEPE) Team, CEA-CNRS-Université Paris Sud) pour le spoligotypage (ADN témoin négatif : LG 1008 2010 et ADN témoin positif : HL 0428 3017, ADN souche CIP PARIS).
-

En 2015 :

- 11 extraits d'ADN de prélèvements respiratoires envoyés au département marketing Diagenode pour vérification de résultats obtenus en PCR par le Kit Diagenode
- 4 échantillons d'urines positives à bioMérieux pour évaluation de lots du test bioNexia®
- 3 échantillons d'urines positives au laboratoire du CH de Macon pour la réalisation de leur dossier d'accréditation
- 2 souches *L. pneumophila* sérotype 4 envoyée respectivement au laboratoire d'hygiène de l'hôpital Purpan à Toulouse et au laboratoire départemental vétérinaire et d'hydrologie de Haute Soane situé à Vesoul
- 94 souches cliniques de l'étude ACIP (74 souches du Cameroun et 20 souches de Dakar) pour séquençage à Carmen Buchrieser au laboratoire Pasteur à Paris
- 12 souches de différentes *Legionella* non *pneumophila* au Pr. Thorsten Kuczius à l'université de Munster en Allemagne
- 74 extraits d'ADN de souches cliniques et environnementales de l'épidémie de Lens envoyés à Vicki Chalker du PHE à Londres, UK.
- 1 souche de *Legionella* spp. (HL 0431 3028) non identifiable, une nouvelle espèce en cours de description envoyée à Christian Lück, Laboratoire national de référence des Légionelles, Dresde, Allemagne (HL 0431 3028)
- 1 lignée d'*Acanthamoeba castellanii* à Maelle Molmeret, MAPIEM EA 4323, Université de Toulon
- 1 lignée d'*Acanthamoeba polyphaga* à Maelle Molmeret, MAPIEM EA 4323, Université de Toulon

3.3- CONSEIL AUX PROFESSIONNELS ET AUX AUTORITES DE SANTE

3.3.1- Conseil aux professionnels

3.3.1.1- Enseignements, formations et conseils

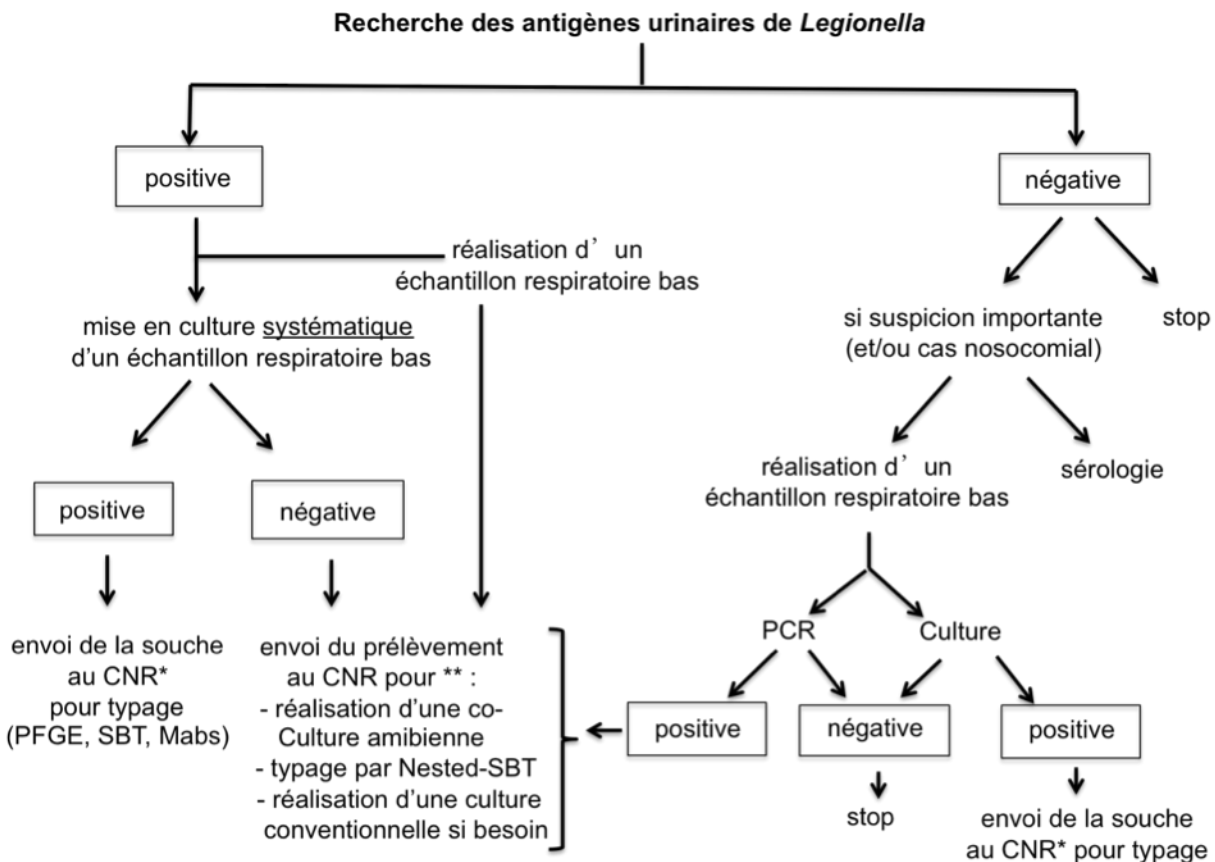
* Conseils

- Conseils téléphoniques ou par courriers électroniques (en moyenne de 1 à 10 conseils par jour) essentiellement pour les microbiologistes et cliniciens (conseil diagnostique, thérapeutique, typage), ARS (interprétation des résultats, information sur les méthodes de typage, conseil), médecins du travail sur les informations à donner aux personnels en cas de légionellose ou de dépassement de seuils environnementaux, et EHOP sur les méthodes de décontamination des sites. Des avis réguliers sont donnés sur les tests évalués par le CNR (kits urinaires, sérologie ou PCR) ainsi que des conseils techniques (méthodologie, choix milieux de culture, concentration des urines, sensibilité aux antibiotiques ...). Les appels téléphoniques sont redistribués en fonction des demandes par les secrétaires. Les spécificités des correspondants (aspect diagnostic clinique, lien de clonalité, environnement...) et leurs coordonnées sont indiquées sur les lettres de rendu de résultat ou au niveau du site internet.

- Des courriers réponse individuels et spécifiques pour chaque souche d'origine clinique et chaque investigation sont adressés ainsi que pour les cas de diagnostic difficile (près de 700 courriers).

* Proposition d'algorithme pour le diagnostic

Afin d'améliorer le diagnostic et favoriser les enquêtes épidémiologiques, le CNR a proposé une conduite à tenir pour le diagnostic des légionelloses et l'envoi des souches et prélèvements au CNR (Figure 12). Cette conduite à tenir a été diffusée par différents moyens (guide, congrès FMC à la Ricai, REMIC...).



* toutes les souches de légionelles d'origine clinique doivent être envoyées au CNR

** les prélèvements respiratoires bas peuvent être adressés au CNR pour culture, co-culture ambiante et typage par SBT directement sur prélèvement en cas de recherche d'antigène urinaire positif ou en cas de forte suspicion de légionellose. Cet envoi pourra être demandé par l'ARS lors d'une investigation épidémiologique.

Figure 12. Proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose et d'envoi des prélèvements au CNR.

* Enseignements et formations

Le CNR participe au renforcement du diagnostic de légionellose et de l'investigation des cas de légionellose par **différents programmes de formation** avec notamment :

- Participation à l'organisation de la session dédiée au typage des *Legionella* - **Postgraduate Educational course – molecular typing methods for pathogens**, sous l'égide de la Société Européenne de Microbiologie et de maladies infectieuses (ESCMID) 30 Juin au 4 Juillet **2014**, Lyon - intervention de 3 groupes ESCMID (ESGMD, ESGLI and ESGS). Il a regroupé près d'une trentaine de jeunes médecins, microbiologistes et vétérinaires venus de 15 pays

différents. Ils ont pu écouter et échanger avec 18 experts européens impliqués dans la caractérisation moléculaire tant au niveau des outils les plus récents développés dans ce domaine que dans leur utilisation au quotidien. La partie théorique était complétée par des démonstrations techniques et par la prise en main des outils informatiques dans des salles équipées et dédiées à ces « travaux pratiques ». Le CNR des Légionelles a plus particulièrement participé par 2 présentations et à l'organisation de 2 après midi sur la technologie PFGE et d'une après midi sur l'analyse de données (PFGE et MLST/SBT).

- Module de formation initiale des ingénieurs d'études sanitaires, Ecole des hautes études en santé publique (EHESP), Rennes : Les méthodes de détection des légionelles (antigénurie, culture et techniques moléculaires, typage des souches, limites des techniques, 2012 (S. Jarraud)
- Master "Infectiologie Cellulaire et Moléculaire, Vaccinologie", module "Contaminations Microbiennes et Santé publique", la vie des *Legionella* de l'amibe au macrophage, de Médecine de Tours, 2012, 2014, 2015 (S. Jarraud).
- DU hygiènes pour les soignants, Legionellose nosocomiale, Marseille, 2012 (S. Jarraud)
- Vigilance environnementale : Actualités sur *Legionella* et surveillance des eaux (Monique Reyrolle), Avril 2012, Lyon
- Arlin clin sud est Lyon : *Legionella* et surveillance des eaux par culture et PCR, (Monique Reyrolle), mai 2012, Lyon
- Séminaire Biorad Paris : Utilisation de la PCR pour la prévention des cas (Monique Reyrolle), Juin 2012
- Clin HCL : Bilan HCL cas et des analyses des eaux (Monique Reyrolle), mai 2012
- Girpy Lyon : Surveillance des eaux (Monique Reyrolle), Juin 2012
- CHU Besançon : Diagnostic et prévention des cas à l'hôpital (Monique Reyrolle), Octobre 2012
- Colloque bioMérieux Paris : Actualités sur *Legionella* et légionelloses (Monique Reyrolle), Octobre 2012
- Impact de la surveillance des cas de légionellose sur la compréhension de la maladie, réunion scientifique, Centre de Biologie Est, Groupe Hospitalier Est, Lyon, (S. Jarraud) février 2013 (1h)
- « *Legionella*, aspects épidémiologiques », UV Hygiène hospitalière & Stérilisation, Faculté de Pharmacie de Lyon, (Ghislaine Descours) décembre 2014 (1h30), Lyon
- 2^{èmes} journées du GREPI, table ronde, (Gérard Lina) 4 et 5 décembre 2014, Chantilly
- *Legionella*, aspect diagnostique et épidémiologique, cours de Microbiologie, Institut Pasteur (2h), (S. Jarraud) 2013, 2014 et 2015, Paris
- UE bactériologie et pathologie, Master 1, Université catholique de Lyon. Legionella et légionellose, (S. Jarraud et G. Descours) 2014, 2015
- Les légionelloses à *Legionella* non Lp1 ; les mécanismes de résistance et les moyens de dépister la résistance aux antibiotiques, séminaire Hôpital Bichat, (S. Jarraud) 6 juin 2014, Paris
- Module de formation "Epidémiologie moléculaire appliquée à la surveillance et au contrôle des maladies infectieuses" organisée à l'InVS, Château de Vacassy, Hôpital Saint Maurice, (S. Jarraud et Ghislaine descours) 2013, 2015 (1h)
- Vigilance environnementale, Risques liés à l'eau : *Legionella*, CCLIN Sud Est, (S. Jarraud) 9 avril 2015

3.3.1.2- Accueil de stagiaires

Le CNR accueille volontiers en plus des étudiants en Médecine, Pharmacie, Biologie, Master ou Thèse, des stagiaires du monde académique, hospitalier ou d'entreprises privés. Un livret d'accueil est fourni aux stagiaires ainsi qu'une charte du laboratoire qu'il doit remplir et signer. Cette charte inclut la notion d'astreinte à la confidentialité et au secret professionnel.

* Stagiaires professionnels

2012

- Sanaa Lemriss, laboratoire de recherche et analyses médicales de la gendarmerie royale (Maroc, Rabat) : méthodes de diagnostic clinique pour mise en place au Maroc, surveillance des cas (2 jours, février 2012)
- Amina Benabbou Institut pasteur d'Alger, identification des souches de légionelles, PFGE (1 semaine, mai 2012)
- F.Larue et S.Chautard, laboratoire Carso Lyon : techniques d'identification et épidémiologique utilisées au CNR (1 journée (Novembre 2012)

2013

- Mireille Favard, Laboratoire Charles Nicolle Environnement de Casablanca, Maroc : stage dans le cadre d'une démarche d'accréditation pour la surveillance environnementale des légionelles par culture selon la norme NF T90-431.
- Souad Silhadi, Centre Hospitalier d'Aix-les-Bains : stage dans le cadre d'une démarche d'accréditation pour la

surveillance environnementale des légionelles, 5 juin 2013

- Pascale Pricaz, Centre Hospitalier d'Aix-les-Bains : stage dans le cadre d'une démarche d'accréditation pour la surveillance environnementale des légionelles, 5 juin 2013

2014

- Marie-Josèphe SOLAREK et Chantal MARTINET, formation pratique et théorique sur la recherche de *Legionella* dans les eaux, Laboratoire BOUVIER, ROANNE, 24 et 25 février 2014
- Docteur Kahima SOUAMI, Institut Pasteur d'Alger, transfert de techniques utiles au diagnostic des légionelloses, 22 – 26 Septembre 2014

* Stagiaires étudiants

2012

- Angélique Dupont, Master 1ere année Biologie et Environnement, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 2012 : Étude de la multiplication intracellulaire de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 dans les cellules intestinales Caco-2.
- Raphaël Simon, Certificat de Maîtrise en Sciences Biologiques et Médicales, 'U.E.' Physiopathologie des maladies transmissibles : Analyse spatio-temporelle des Complexes Clonaux de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 prédominants en France entre 2008 et 2011, Juin 2012
- Auriane Suet, thèse de doctorat d'état en Pharmacie : Evaluation de l'apport de la co-culture amibienne dans le diagnostic et l'investigation des cas de légionelloses, 19 Avril 2012
- Raya Harich, thèse de doctorat d'état en Pharmacie : Production d'antigènes de *Legionella pneumophila* par co-culture avec *Acanthamoeba castellanii* et utilisation de ces antigènes pour le sérodiagnostic. Comparaison à la méthode de référence au Centre National de Référence des légionelles, Faculté de Pharmacie, UCB-Lyon I, le 26 Octobre 2012.

2014

- Joséphine Charavit, IUT Génie Biologique, 2^{ème} année, stage de fin d'études à temps plein : détermination de la sensibilité aux antibiotiques de 109 souches de *Legionella pneumophila*, 10 avril – 27 juin 2014
- Sylvain Ichouza, deuxième année de DUT Génie Biologique, 2^{ème} année, stage de fin d'études à temps plein : Caractérisation phénotypique d'une centaine de souches de *Legionella* : comparaison de la multiplication intra et extra cellulaire à l'aide de plasmides fluorescents, 10 avril – 27 juin 2014
- Nour el islem Refoufi : Faculté de Pharmacie de Lyon, 5^{ème} année hospitalo-universitaire, stage à temps plein : Identification et typage des souches *Legionella pneumophila* par anticorps monoclonaux : transfert méthodologique de l'IFI à l'ELISA, 2 juin – 30 août 2014
- Guillaume Maccio et Nicolas Vernet, Faculté de Pharmacie de Lyon, 5^{ème} année hospitalo-universitaire : participation à l'évaluation du kit urinaire bioNexia®, avril – septembre 2014
- Réhane Ottaviani, IUT à l'Institut de Formation de Technicien de Laboratoire Médical (IFTLM) : Place de la méthode Maldi Tof pour l'identification et le typage des légionelles, 13 octobre - 19 décembre 2014

2015

- Margot Carpentier, Institut Universitaire de Technologie département « Génie Biologique » : Extraction et purification du LPS de *Legionella pneumophila* pour la comparaison de 3 méthodes de détection des antigènes urinaires : BinaxNOW®, Binax® EIA et Sofia® ICT
- Hélène Hannellet et Jean-Victor Reynaud, Faculté de Pharmacie de Lyon, 5^{ème} année hospitalo-universitaire ; évaluation de l'apport de la technique d'*Amoebae Plate Test* pour l'isolement de souches cliniques de *Legionella*, février – septembre 2015
- Maeva Bonnardel, Institut Universitaire de Technologie département « Génie Biologique » : Mise au point et évaluation d'une technique de sous groupage de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 par ELISA indirect.
- Tarik ERBILICI : Faculté de Pharmacie de Lyon, 5^{ème} année hospitalo-universitaire, stage à temps plein : Mise au point et évaluation d'une méthode de typage de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 par technologie MALDI-TOF.

* Encadrement de thèses d'Université et Master en lien direct avec le CNR

Thèse d'Université, Université Claude Bernard Lyon 1

- Ghislaine Descours : *Legionella pneumophila* et macrolides : de l'antibiogramme à la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance (S. Jarraud, co-encadrant C. Ginevra) (novembre 2011 – décembre 2013)

- Pierre Cassier : Etude de la non-délectabilité de la souche *Legionella pneumophila* Sequence Type ST47 pusetype Lorraine dans l'environnement (Encadrement Jérôme Etienne)
- Marine Vandewalle : Caractérisation de l'effet de peptides antimicrobiens humains sur l'infection par *Legionella pneumophila* (novembre 2013 – en cours) (Co-encadrement C. Ginevra, S. Jarraud)
- Anne Gaëlle Ranc : Etude des facteurs bactériens associés à la sévérité de la légionellose (mars 2014 – en cours) (Co-encadrement G. Lina, S. Jarraud)

Master

- Clémence Massip : Caractérisation de pompes à efflux TolC-dépendantes et rôle dans la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides, Master 2 Recherche Infectiologie Fondamentale, Université Lyon 1 (Encadrement G. Descours, septembre 2014 – juin 2015)
- Thomas Verger : Conception et mise en place de la base de données BioNumerics du CNR des Légionelles (Co-encadrement S. Jarraud, O. Dauwalder) (2014 – en cours), Master 2 Management des Biobanques de l'ESTBB (Ecole Supérieure de Biologie – Biochimie – Biotechnologies, Lyon)
- Camille Kolenda, Master 1 « Physiopathologie des maladies transmissibles », Université Claude Bernard Lyon 1 : évaluation de la technique de co-culture ambiante APT (*Amoebae Test Plate*) pour l'isolement de *Legionella* à partir de prélèvements cliniques, avril à juin 2013
- Thomas Berger, Master professionnel « Management des biobanques », Université Catholique de Lyon : mise en place de la base de données Bionumerics, juin à août 2013.
- Emilie Talagrand : Résistance de *Legionella pneumophila* à la cathélicidine humaine LL-37, Master 2 Recherche (Juin 2013)
- Xavier Bernasconi, Master professionnel « Management des biobanques », Université Catholique de Lyon : mise en place de la base de données Bionumerics, 2 juin – 29 août 2014

Ingénieur Conservatoire des Arts et Métiers (CNAM), Paris

- Nathalie Jacotin : *Legionella pneumophila* et macrolides : développement et évaluation d'une PCR de détection de la résistance (Co-encadrement S. Jarraud, C. Ginevra), 2013-2014, soutenance le 22 mai 2014

3.3.1.3- Guides élaborés

- Risque lié aux légionelles. Guide d'investigation et d'aide à la gestion. Haut Conseil de la Santé Publique (11 juillet 2013). Actualisation des recommandations relatives à la conduite à tenir devant un ou plusieurs cas de légionellose ou face à une contamination environnementale. Diffusion du guide sur le site en ligne du HCSP. (http://www.hcsp.fr/Explore.cgi/Telecharger?NomFichier=hcspr20130711_risqlégionnelguideinvestigation.pdf)

3.3.1.4- Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :

- **Site internet** : le CNR dispose d'un site web (<http://cnr.univ-lyon1.fr>) qui présente notamment les activités du CNR, le mode de fonctionnement, les modalités d'envois, les fiches à télécharger, et les personnes à contacter. Des fiches de renseignement par exemple sur le typage des souches de légionelles à la recherche de la source de contamination sont renseignées. Des fiches de demande d'analyses dédiées aux laboratoires ou aux ARS peuvent être renseignées directement sur le site et envoyées par messagerie électronique. Un site spécifique dédié à l'étalon ADN a été réalisé en Français et en Anglais dans l'objectif d'une distribution européenne de cet étalon. Ce site est accessible par la page d'accueil du site web du CNR. Il est indexé dans google.
- Sur le site **web EWGLI** : mise en ligne de nos **données de SBT** dans la base de données européennes de SBT
- **Organisation de Congrès Français** : Depuis 2007, le CNR organise tous les 2 ans un symposium en langue Française sur *Legionella*, SympoLegio (SympoLegio 2013, Lyon, 26 et 27 Novembre 2013 (200 participants), SympoLegio 2015, 17 et 18 Novembre 2015, (Programme 2015 en annexe 7). Les thèmes abordés sont la gestion des épidémies et l'analyse des risques, le contrôle et la prévention, *Legionella* et ses environnements, *Legionella* et ses hôtes eucaryotes, la

physiopathologie, la virulence, la résistance, et la susceptibilité aux infections et enfin la génomique et l'évolution de *Legionella*. Ces symposiums regroupent des cliniciens, épidémiologistes, microbiologistes cliniques, environnementalistes chercheurs académiques, représentants des agences de contrôle, de gestion de risque, de surveillance et des industriels.

- **Une conférence Formation médicale continue** sur « Les dix erreurs à ne pas faire dans le diagnostic des légionelloses » (RICAI, 21-22 Novembre 2013) a permis de sensibiliser de nombreux bactériologistes sur les points critiques notamment aux tests de détection des antigènes dans les urines, à la PCR et à la culture de prélèvements pulmonaires 33^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Plusieurs microbiologistes nous ont contacté suite à cette formation.
- Conseil par le biais de chapitre d'ouvrage dans des **référentiels ou des livres faisant référence** (Remic, antibiogramme)
- **Chapitres d'ouvrages** publiés dans *Methods in Molecular Biology* relatifs aux méthodes recommandées pour l'identification de *Legionella* dans les prélèvements cliniques (PCR, antigènes urinaires, culture) et le typage des *Legionella* :
 - Chapitre "Identification of *Legionella* in Clinical Samples" de la revue *Methods in Molecular Biology*. 2013, S Jarraud, G Descours, C Ginevra, G Lina and J Etienne.
 - Chapitre. "Typing methods for *Legionella*" de la revue *Methods in Molecular Biology*. 2013, Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG *Methods Mol Biol*. 2013;954:119-48.
 - Chapitre "Molecular typing of *Legionella*" du livre "Molecular typing of bacteria", Humana press, 2013, C Ginevra.
- **Les données de surveillance** peuvent être publiées en collaboration avec d'autres institutions notamment l'InVS dans des journaux internationaux à comité de lecture :
 - Campese C, Jarraud S, Sommen C, Maine C, Che D. Legionnaires' disease in France: sensitivity of the mandatory notification has improved over the last decade. **Epidemiol Infect** 2013:1-6.
- Précis de Bactériologie Clinique, 3^{ème} édition, Chapitre « *Legionella* » : on en est où ?

3.3.2- Conseil aux autorités de santé

Dans les domaines du diagnostic, du traitement et du typage :

- **ECDC** - Nomination comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen pour l'ECDC (Sophie Jarraud) (depuis 2010)
- **HCSF**
 - Membre du groupe de travail du Haut Conseil de la Santé Publique – commission spécialisée Maladie transmissibles : révision du guide d'aide à l'investigation des cas de légionellose (2012 – 2013) (S. Jarraud)
 - Membre du groupe de travail sur un projet de décret et un projet d'arrêté relatifs à l'encadrement de l'utilisation des systèmes collectifs de brumisation d'eau (saisine des deux commissions CSMT et CSRE) (2016) (S. Jarraud)

Dans le domaine de l'environnement

- **ANSES – InVS** - Membre du Comité de pilotage (COPIL), Etude sur l'impact des retombées de panaches émis par les tours aéroréfrigérantes des centres nucléaires de production d'électricité d'EDF sur la survenue de cas de légionellose en collaboration avec l'ANSES et l'InVS (2010 – 2013, S. Jarraud)
- **ANSES** – groupe de travail un groupe de travail « q-PCR légionelles ».mission principale de ce groupe de travail sera l'analyse d'un rapport mandaté par le ministère de l'écologie relatif à la pertinence des méthodes analytiques par culture et par q-PCR pour le contrôle réglementaire des eaux de circuits de refroidissement des tours aéroréfrigérantes (2016, Maud Baume).
- **AFNOR** - Membre de la commission AFNOR de Normalisation : Détection des *Legionella* – méthode alternative, AFNOR T90E, Norme XPT 90-471 puis NFT 90-471 (depuis 2007) (S. Jarraud puis M. Baume)

- **AFNOR** - Membre de la commission AFNOR de Normalisation : NF T90-431 Septembre 2003 : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation (Monique Reyrolle puis M. Baume)

Expertises

- Expertise externe d'un Centre national de Référence pour un pays européen
- **Instances judiciaires.** Le CNR est intervenu auprès des instances judiciaires à plusieurs reprises afin d'apporter son expertise notamment concernant l'épidémie de Lens, Jérôme etienne).

3.4- CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE

3.4.1- Au niveau national

3.4.1.1- Interface avec l'InVS

Périodicité : Les échanges avec l'InVS sont pluri-hebdomadaires (téléphoniques, courriers électroniques, fax, courriers postaux)

Ces échanges ont pour objectifs:

- de valider les cas de légionellose posant problème
- de s'informer mutuellement des investigations en cours (résultats de typage, prélèvements adéquats à réaliser, etc.)
- d'initier de nouvelles études ou analyses communes

Echanges de données :

- Notification du CNR à l'InVS des diagnostics par culture (par email et télécopie). L'InVS recoupe les informations avec les DO reçues. Cette notification systématique a pour objectif d'identifier les cas n'ayant pas fait l'objet d'une déclaration à l'ARS. De 2011 à 2015, toutes les souches signalées sur la DO ont été transmises au CNR.
- En 2015, suite au changement du logiciel informatique du CNR (passage de Molis à Glims), un nouveau fichier Excel commun a été mis en place permettant d'associer des données du CNR et de l'InVS. Chaque fin d'année, les données de ce fichier concernant les cas de légionellose validés par l'InVS et le CNR sont finalisées par l'InVS (Christine Campese) et le fichier est renvoyé au CNR. Le bilan d'activité du CNR concernant la surveillance des cas de légionellose s'appuie sur ces données.
- L'InVS fournit toutes les informations utiles au CNR lors des investigations épidémiologiques. En retour, le CNR fournit par courrier les résultats de typage épidémiologique de la(les) souche(s) clinique(s) isolée(s) et de(s) souche(s) environnementale(s). Cette information est également transmise par le CNR à l'ARS qui a demandé l'analyse.

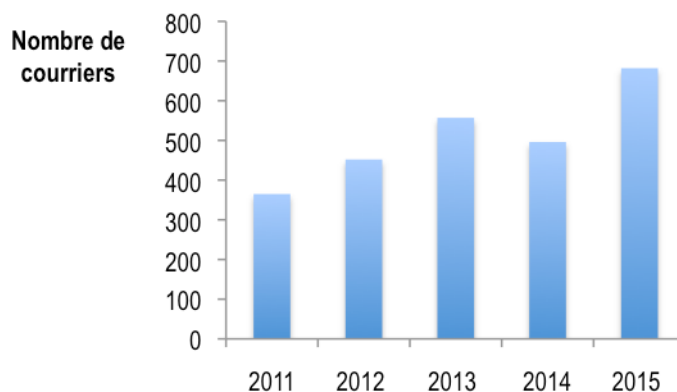
Ajoutés à ces contacts fréquents, l'InVS et le CNR ont mis en place une réunion annuelle dont l'objectif est de discuter des modifications organisationnelles et des études conjointes en cours et à programmer pour les années à venir.

- 23 Janvier 2014 au CNR (Sophie Jarraud, Christophe Ginevra, Didier Che et Christine Campese de l'InVS)
- 3 Octobre 2014 à l'InVS (Sophie Jarraud, Christine Campese, Agnes Lepoutre, Daniel Levy-Bruhl, Jean Paul Guthmann)

En 2015, dans le cadre de l'investigation de cas, 682 courriers personnalisés ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à l'InVS.

De 2012 à 2015, dans le cadre du diagnostic des cas de légionellose et de l'investigation de cas, **plus de 2100 courriers personnalisés** ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à l'InVS (Figure 13).

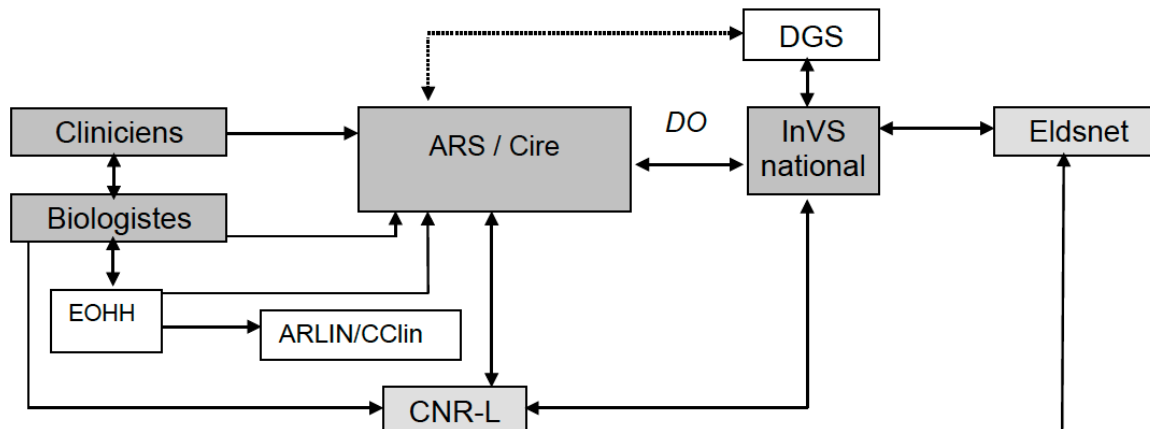
Figure 13. Evolution du nombre de courriers envoyés aux ARS, laboratoires et InVS dans le cadre d'investigation de cas.



3.4.1.2- Réseau de partenaires – couverture nationale

Nos partenaires ont été l'InVS, les Agences Régionales de Santé (ARS), la Direction Générale de la Santé (DGS), le Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, les Cellules Inter-Régionales d'Epidémiologie (CIREs), les Directions Régionales de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL), les laboratoires de microbiologie de CHG et de CHU, les laboratoires d'analyses environnementales, les équipes d'hygiène opérationnelles (EHO) et les cliniciens. (Figure 14). Nous avons environ 280 correspondants hospitaliers et près de 100 correspondants environnementaux. Le réseau couvre l'ensemble du territoire Français.

Figure 14. Schéma du système de surveillance de la légionellose en France (source : risque lié aux légionelles – Guide d'investigation et d'aide à la gestion – HCSP, 2013)



En 2015, nous avons été en contact avec les ARS de PACA, Rhône-Alpes, Ile de France, Alsace Lorraine, Nord Pas-de-Calais, Bourgogne Franche-Comté, Centre Val-de-Loire, Provence Alpes Côte d'Azur, Antilles Guyane, Val de Loire, Midi-Pyrénées, Languedoc Roussillon, Poitou-Charentes, Pays de la Loire et Auvergne.

Un gradient géographique Ouest-Est du taux d'incidence des cas notifiés de légionellose est observé en France et celui-ci est toujours marqué en 2015 ; l'incidence variait de 1,0/100 000 habitants en Bretagne à 4,8/100 000 habitants en Franche-Comté (Figure 15). Ce gradient géographique fait l'objet d'une étude multifactorielle menée par Santé Publique France qui vise à expliquer ces disparités d'incidence de la légionellose sur le territoire.

En 2015 le CNR n'a pas reçu de souches d'origine clinique de deux régions, Basse-Normandie et Corse, région à faible

incidence d'environ 1. Sur la carte ci dessous nous pouvons observer que le nombre de souches reçues au CNR par région ne reflète pas toujours l'incidence des cas pour ces régions. Ces données nous permettrons d'inciter la mise en culture de prélèvements pulmonaires dans les régions à faible niveau d'isolement (Figure 15).

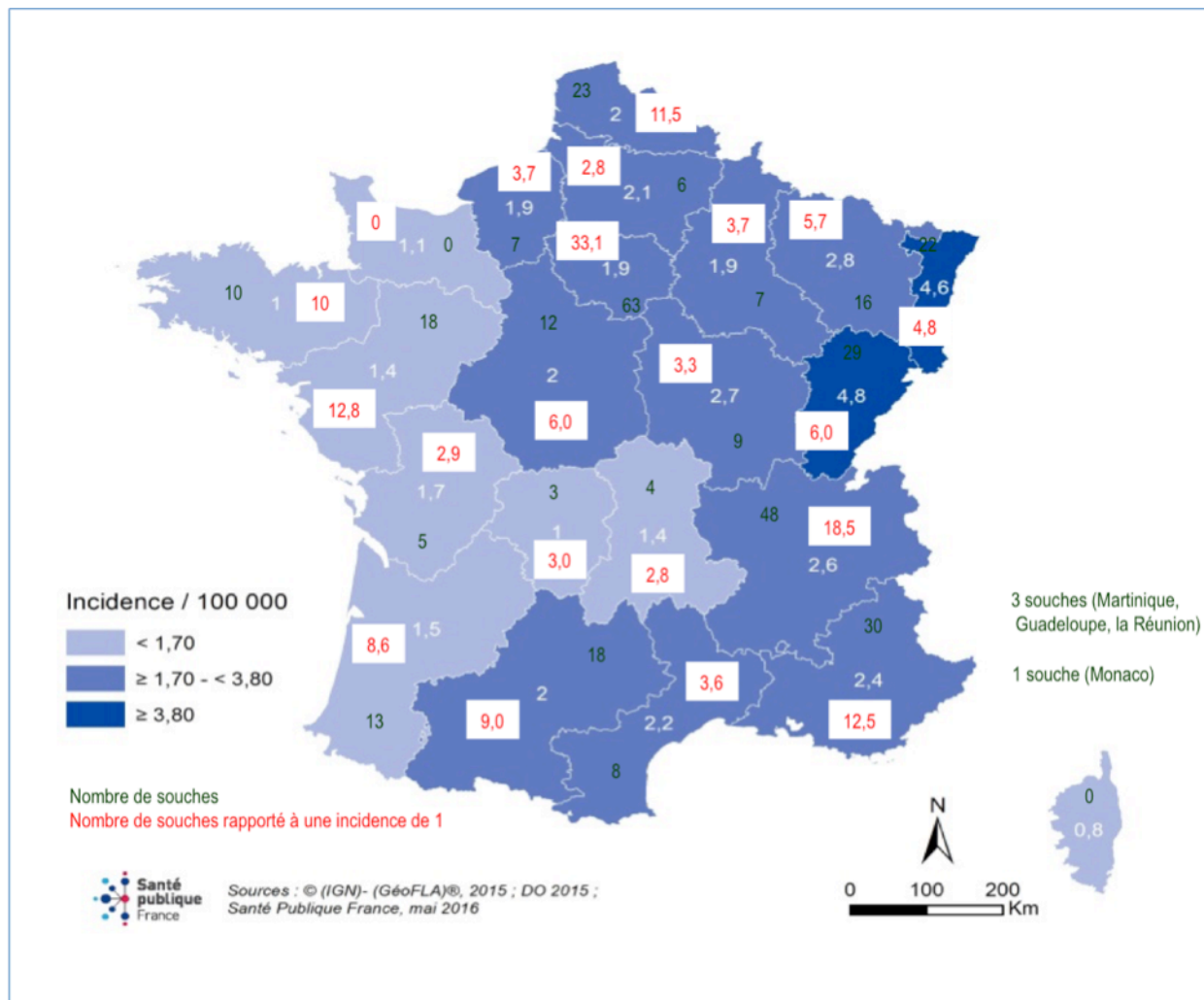


Figure 15. Distribution du taux d'incidence standardisé (sur le sexe et l'âge) de la légionellose selon la région (ancienne) de domicile en France métropolitaine, 2015 (chiffre en blanc). A été ajouté à cette carte de Santé Publique France, le nombre de souches d'origine clinique par région expertisé au CNR (en vert) et le nombre de souche rapporté à une incidence de 1 (en rouge).

3.4.1.3- Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des légionelloses en interface avec l'InVS

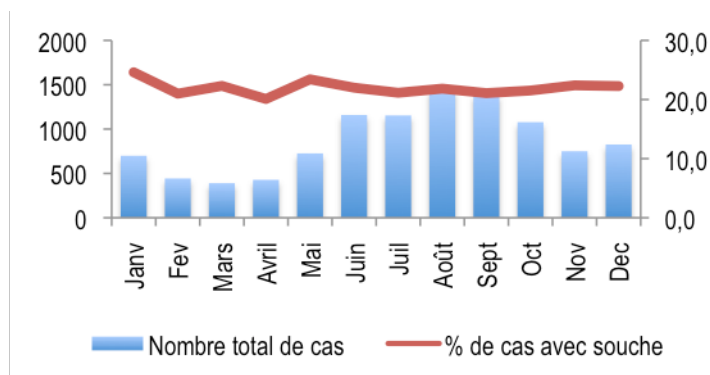
* Caractéristiques générales des patients avec et sans souches disponibles

Le bilan de 2015 réalisé par l'InVS montre une stabilité de l'ensemble des caractéristiques des cas de légionellose que ce soit en terme d'âge, de sexe, de saisonnalité ou du gradient géographique «Ouest-Est».

De nombreuses études sont réalisées par le CNR sur les souches isolées des patients afin notamment d'identifier des marqueurs de pathogénicité ou de sévérité. Nous représentons ci-dessous les caractéristiques des cas pour lesquels une souche est disponible en comparaison aux caractéristiques des cas sans souche disponible afin de vérifier si ces cas sont représentatifs ou non de l'ensemble des cas. Cette analyse a été réalisée avec l'aide de C. Campèse de l'InVS sur la période 2008 – 2015 afin d'avoir un nombre suffisant de cas avec souche.

Une prédominance des cas est observée en juillet, août et septembre. Les cas avec souches suivent la même périodicité car le pourcentage des cas avec souche est stable au cours des mois de l'année (Figure 17).

Figure 16. Nombre de cas de légionellose notifiés en France de 2008 à 2015 selon le mois de début des signes, et pourcentage de souches disponibles



En 2015, les données de l'InVS montrent que l'âge médian des cas était de 63 ans et le sexe ratio homme/femme était de 2,5. L'incidence augmentait avec l'âge et les taux d'incidence les plus élevés s'observaient chez les personnes de plus de 80 ans (6,4 / 100 000).

Lorsque l'on considère les cas et non pas l'incidence, le pourcentage de culture positive est plus important pour les patients de moins de 30 ans (27,7%) et le moins important pour les patients de 80 ans et plus (14,7%). Ceci est probablement lié à la difficulté d'obtenir des prélèvements chez ces derniers patients et pourrait être en lien pour les plus jeunes patients a des légionelloses plus sévères ou à la réalisation plus systématique de prélèvement pour isoler la bactérie.

De même, le pourcentage de souches isolées est plus important pour les hommes (23,1% des cas masculins) que pour les femmes (18,7% des cas féminins) (Figure 18).

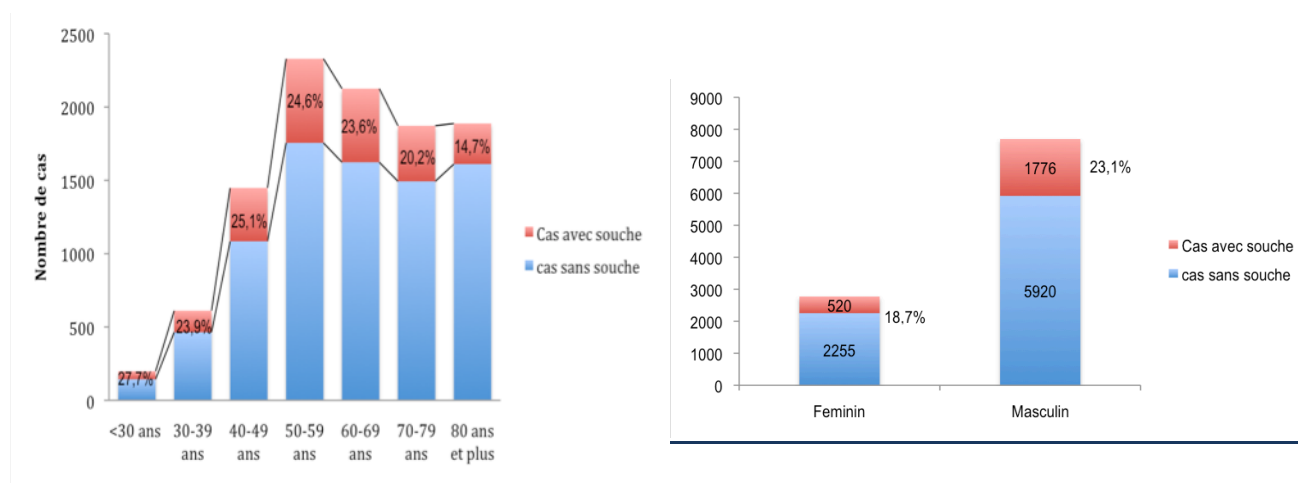
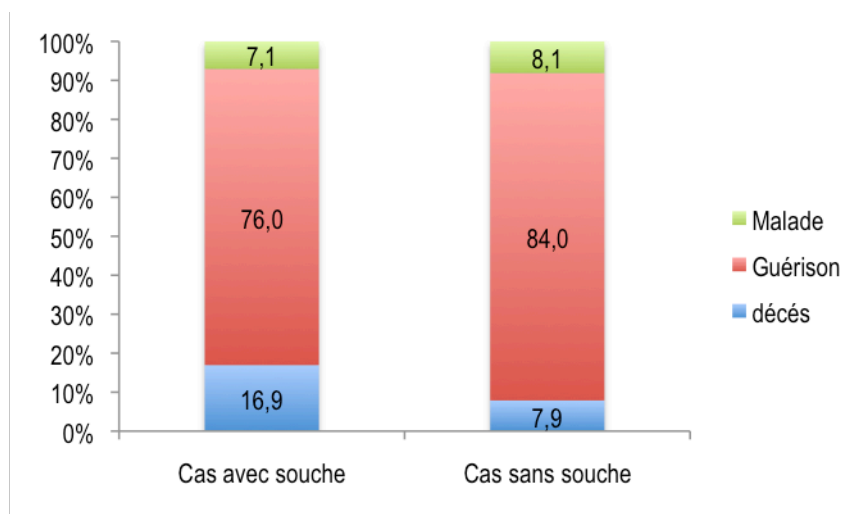


Figure 17. Nombre de cas par classe d'âge et par sexe des cas de légionellose notifiés en France de 2008 à 2015, avec ou sans souches disponibles

Enfin, les légionelloses diagnostiquées chez les patients pour lesquels une souche est isolée sont plus sévères avec un décès observé dans près de 17% des cas versus 7,9% pour les cas sans souche disponible. Pour cette période de 2008 à 2015, la mortalité globale pour l'ensemble des cas était de 9,9% (Figure 19).

Figure 18. Evolution (Guérison, encore malade, Décès) des cas avec souche et des cas sans souche notifiés en France de 2008 à 2015



Les expositions à risque des cas seront détaillés chapitre 3.4.1.5.

* Surveillance des cas de légionellose atypiques

* Cas de persistance ou réinfection

Le point le plus marquant durant ces 4 dernières années est la description de plusieurs cas de persistances ou récives de pneumonie à *Legionella*. Ces descriptions ont fait l'objet d'une communication au SympoLegio 2015. Un total de 10 cas cliniques de légionellose atypiques ont été caractérisés par la détection de *Legionella* dans les poumons sur une durée anormalement longue, allant de 2 mois à 1 an, avec ou sans période d'amélioration clinique ou de guérison pendant cette période. Plusieurs hypothèses ont été envisagées permettant d'expliquer la durée de ces infections (persistance d'une infection à bas bruit malgré une évolution clinique initialement favorable, réinfection, apparition de résistance au traitement, présence d'un abcès, récurrence de l'infection en lien avec une colonisation du tractus respiratoire qui jusqu'ici n'a jamais été démontrée). Au cours des investigations, les isolats disponibles ont été génotypés, la résistance aux antibiotiques recherchée par des méthodes phénotypiques et/ou moléculaires (PCR et NGS), la présence d'abcès recherchée par imagerie. Les souches disponibles ont été séquencées.

Ces différentes investigations, ont permis de mettre en évidence une réinfection certaine, une réinfection possible au domicile du patient et 8 cas de persistance de *Legionella* dans les poumons sur plusieurs semaines. Aucune résistance au traitement n'a pu être mise en évidence. La présence d'un abcès rendant le traitement inefficace semble être la cause de 4 infections persistantes. Le statut immunitaire particulier de 4 patients semble être à l'origine des autres infections persistantes.

Nous avons séquencé les souches des patients (un total de 37 isolats pour 6 patients) dans l'objectif d'identifier des mutations en lien avec la persistance de la bactérie et de comparer les résultats à ceux obtenus *in vitro* par Ensminger *et al.* (2012) après évolution de la bactérie dans une lignée cellulaire de macrophages pendant des centaines de génération. Ils ont montré que les souches évoluées ont accumulé plusieurs mutations adaptatives, se répliquant mieux dans les macrophages que les souches ancestrales. Ils ont identifié des mutations corrélées avec un meilleure *fitness* notamment dans le gène codant le régulateur de flagelle FlcN ou la voie de biosynthèse de la lysine. Ces mutations concourent à un avantage pour la répliquon dans les macrophages mais pas dans les amibes.

Nous avons particulièrement étudié l'évolution **génétique de *Legionella pneumophila in vivo* chez un patient immunocompétent** pour lequel nous avons séquencé 17 isolats isolés sur une période de 6 semaines. Le séquençage de ces souches a été réalisé en partenariat avec la plateforme de séquençage des Hospices Civils de Lyon et. Dans le but de visualiser de potentiels réarrangements chromosomiques et/ou des modifications de la méthylation de l'ADN bactérien au cours de l'infection, le 1^{er} et le dernier isolat ont été séquencés en utilisant la technologie PacBio Science par la plateforme Genomic Technologies Facility de l'université de Lausanne. Aucun réarrangement ni aucune variation de la méthylation n'ont été observées entre ces 2 génomes. Cette analyse a néanmoins permis d'identifier un élément intégratif et conjugatif présent à la fois sous forme épisomique et sous forme intégré au chromosome dans les 2 isolats.

Nous n'avons pas observé de SNPs entre les souches isolées parfois plusieurs mois entre les épisodes. Ces observations sont en accord avec les récentes publications sur l'évolution des *Legionella* observée par l'analyse de centaines de génomes isolées chez l'homme ou dans l'environnement. L'évolution de *Legionella* et sa grande diversité est liée à des hauts taux de recombinaison et échange d'ADN par conjugaison. Par contre *Legionella pneumophila* semble caractérisée par de faible taux de mutation évalué notamment pour les souches ST 578 et ST37 a respectivement 0.49 et 0.71 SNPs/genome/year (Sanchez-Buso et al. 2014 et David S. et al. soumis).

Parmi ces 10 cas, nous décrivons ci-dessous deux exemples qui suggèrent des hypothèses différentes concernant ces persistance / réinfection.

Cas n°1

Il s'agit d'un homme de 75 ans, non fumeur, présentant une glomérulonéphrite secondaire à une polyangéite microscopique (PAM) avec atteinte pulmonaire prise en charge par corticothérapie et hémodialyse.

Dans un contexte infectieux sans point d'appel initial pulmonaire évident, une antigénurie *Legionella* revient positive. Un prélèvement de crachats permettra d'isoler des *L. pneumophila* séro groupe 1, pulsotype Paris, ST 1, sous-groupe Olda. Une antibiothérapie par macrolide / fluoroquinolone permettra une évolution rapidement favorable (retour à domicile à J6, traitement total de 16 jours). Sur le plan de l'imagerie, un scanner pulmonaire montre à J63 une amélioration au niveau du parenchyme pulmonaire mais avec persistance de façon moins marquée des 2 foyers de condensation pulmonaire présents initialement.

Un second épisode de légionellose survient après 2 mois de guérison apparente et à J2 de l'introduction d'un traitement par rituximab (Ac anti-CD20) pour la rechute pulmonaire de la PAM. La PCR spécifique *Legionella* puis la culture reviennent positives sur un nouveau prélèvement de crachats. Cette seconde souche Lp1 présente les mêmes caractéristiques que celle du premier épisode. Une antibiothérapie par macrolide permettra à nouveau une évolution favorable.

Les antibiogrammes réalisés sur ces deux souches ne montreront pas de résistance. Aucune mutation associée à la résistance aux macrolides ne sera retrouvée par PCR.

Les investigations sur les réseaux d'eau chaude sanitaire du domicile du patient et de l'hôpital ne permettront pas d'identifier la source de contamination.

L'association de la légionellose à une récurrence pulmonaire de la polyangéite microscopique rend difficile la définition de la date de début des symptômes et de la période d'incubation.

La persistance des foyers primitifs et l'absence d'apparition de nouveaux foyers objectivés au scanner, le délai relativement court entre les deux diagnostics, un traitement par Ac anti-CD20 initié avant le second épisode, l'identité des caractéristiques des deux souches cliniques isolées et l'absence d'identification d'une source de recontamination rendent vraisemblable l'hypothèse d'une guérison incomplète du 1^{er} épisode plutôt que celle d'une ré-infection. Néanmoins, l'hypothèse d'une colonisation du tractus respiratoire (jamais démontrée) ne peut être formellement exclue.

Cas n°2

Il s'agit d'une femme de 70 ans atteinte d'une leucémie lymphoïde chronique (LLC) admise en réanimation pour SDRA sévère. L'antigénurie *Legionella* est négative. La PCR *Legionella* réalisée à partir d'un prélèvement de mini-LBA reviendra positive. On note également une co-infection virale à HSV et virus respiratoires. La culture permettra d'isoler des *L. pneumophila* séro groupe 3, pulsotype sporadique, ST 87. L'évolution sera favorable après 20 jours de bi-antibiothérapie par macrolide et rifampicine.

La patiente sera à nouveau admise en réanimation pour un second épisode de SDRA plus de 4 mois plus tard. Entre temps, on note une évolution défavorable de sa LLC sur le plan hématologique. La PCR sur prélèvement naso-pharyngé puis la culture à partir d'un prélèvement distal protégé reviendront positives avec une souche identique à celle isolée lors du 1^{er} épisode. Un traitement par macrolide et fluoroquinolone est instauré. L'évolution sera à nouveau favorable.

Les antibiogrammes réalisés sur ces deux souches ne montreront pas de résistance. Aucune mutation associée à la résistance aux macrolides ne sera retrouvée par PCR.

Les investigations sur les réseaux d'eau chaude sanitaire du domicile de la patiente mettront en évidence des caractéristiques identiques entre les souches environnementale et clinique.

Dans ce second cas, les données cliniques et les investigations réalisées au domicile ne permettent pas de conclure quant à récurrence de l'infection ou à une ré-infection à domicile, qui néanmoins semble plus probable que dans le 1^{er} cas du fait de la colonisation du réseau d'ECS du domicile de la patiente. A l'inverse du cas n°1, l'absence de scanner ne permet pas de confirmer la persistance ou non d'un foyer pulmonaire.

*** Période d'incubation prolongée et/ou switch d'une colonisation en une pneumonie au décours d'une forte immunodépression chez un receveur de greffe rénale.**

Nous rapportons un cas de légionellose communautaire chez un receveur de greffe rénale plus de 10 jours après l'admission à l'hôpital et sa transplantation. Le réseau d'eau de l'hôpital a été initialement soupçonné, mais les données de typage moléculaire ont démontré que la source probable était le système d'eau chaude sanitaire du domicile du patient. Deux hypothèses ont été suggérées : une période d'incubation supérieure à 10 jours comme cela a déjà été décrit ; la forte immunodépression liée à la greffe de rein a pu entraîner le switch d'une colonisation de *Legionella* ou d'une infection à bas bruit (acquise plus de 10j au domicile) en une pneumonie. Les transplantés notamment rénaux sont des patients à haut risque de développer une légionellose. L'existence d'une colonisation oropharyngée par *Legionella pneumophila* reste incertaine. Jaresova et al. (2006) ont rapporté que *Legionella* pouvait être détectée dans des aspirations oropharyngées de patients transplantés avant l'intervention chirurgicale.

- Cassier P, Bénet T, Nicolle MC, Brunet M, Buron F, Morelon E, Béraud L, Descours G, Jarraud S, Vanhems P. Community-acquired Legionnaires' disease in a renal transplant recipient with unclear incubation period: the importance of molecular typing. *Transpl Infect Dis.* 2015 Oct;17(5):756-60.

Ce cas comme le cas n°1 ou d'autres observations suggèrent la présence de *Legionella* sous forme de colonisation ou d'infection à bas bruit. Une attention particulière doit être portée pour décrire au mieux ces observations qui pourraient avoir des conséquences sur le traitement des légionelloses des patients immunodéprimés et l'interprétation des investigations épidémiologiques des cas.

*** Cas de légionellose à Lp3 chez un nouveau né**

Il s'agit d'un enfant né à terme qui a passé 24h en couveuse pour retard de croissance puis a été hospitalisé sans soins particulier. L'enfant est rentré à domicile à J4 puis a présenté des signes de détresse respiratoire avec fièvre à J27 motivant son hospitalisation en réanimation. L'antigène urinaire *Legionella* était négatif et le diagnostic de légionellose à *Legionella pneumophila* a été posé par le laboratoire de bactériologie de l'hôpital Trousseau à Paris par PCR-séquençage de l'ADN 16S réalisé sur le LBA car la culture était négative. Une souche Lp 2-14 a été isolée dans le LBA. Au regard du délai entre la sortie de l'hôpital et le début des signes, la DT 95 a mené une investigation au domicile qui a montré la présence de Lp3 de profil identique à la souche du nouveau né (même profil PFGE, ST87). Selon les données de l'ARS, l'enfant n'a pas été douché par la maman. Il est par ailleurs nourri au biberon (préparé avec de l'eau minérale exclusivement). L'immeuble est collectif et la température stabilisée de l'eau chaude était faible au moment du prélèvement (45°C).

Sur le plan des investigations immunologiques, le taux total de lymphocytes était bas avec une baisse des CD4+ et CD8+. La recherche d'un déficit immunitaire chez cet enfant est en cours.

*** Endocardite infectieuse à *L. anisa*.** Des décompensations cardiaques répétées chez un patient porteur d'un pace maker ont conduit à un remplacement de la valve aortique par une bioprothèse valvulaire. L'aspect macroscopique de la valve observé par le chirurgien était anormal mais sans végétation ni abcès apparent conduisant à des analyses microbiologiques. Le patient était apyrétique durant l'hospitalisation sans antibiothérapie. L'endocardite infectieuse à *L. anisa* a été diagnostiquée grâce à la PCR 16S révélant une séquence 100% homologue à *L. anisa* et sur l'examen histologique de plusieurs sections de la valve aortique réséquée montrant de petites végétations en présence d'inflammation avec des cellules mononucléées et des cellules géantes suggérant une endocardite infectieuse chronique. Un épisode de toux exacerbée quelques semaines avant la chirurgie a été rapporté par le patient.

Cette observation a été décrite par l'hôpital Georges Pompidou à laquelle le CNR a participé.

- F. Compain, P. Bruneval, S. Jarraud, S. Perrot, S. Aubert, V. Napoly, A. Ramahefasolo, J.-L. Mainardi, and I. Podglajen. Chronic endocarditis due to *Legionella anisa*: a first case difficult to diagnose. *New Microbes New Infect.* 2015 Nov; 8: 113–115.

3.4.1.4- Expertise dans le typage des souches de légionelles

3.4.1.4.1- Développements et mise à disposition de techniques

- Developpement de la technique de spoligotypage sur membrane pour le sous-typage des souches de *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 ST1/pulsotype Paris puis transfert vers une technologie Luminex sur 2 plateformes Luminex (L200® et MagPix®) avec une révélation quantitative automatisée (2011-2012).

Les souches *L. pneumophila* séro-groupe 1 ST1 sont très largement répandus dans l'environnement et sont responsables de nombreux cas de légionellose (5 à 10% de l'ensemble des cas en France) et principalement de cas nosocomiaux. Le CNR a développé la méthode de spoligotypage qui a révélé un pouvoir discriminant de 79,7% pour ces isolats ST1, ce qui en fait un outil génotypique complémentaire pour distinguer les isolats ST1. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Pr. Christophe SOLA, Institut de Génétique et Microbiologie UMR8621, équipe IGEPE, Orsay. Cette technique n'est actuellement disponible qu'au CNR.

Cet outil a été utilisé dans quelques investigations. En 2013, le CNR a utilisé cette technique dans le cadre de 7 enquêtes (6 françaises et 1 suisse). Les souches isolées des sources présumées de contamination présentaient des spoligotypes identiques à ceux des patients pour les 6 enquêtes françaises, ce qui a permis de confirmer l'identification de la source de contamination. En revanche, dans l'investigation suisse, les isolats environnementaux présentaient des spoligotypes différents de ceux des souches cliniques, ne permettant pas de confirmer la source de contamination. En 2014, un épisode de cas groupés dans un établissement de santé sur plusieurs années a été confirmé par la méthode de spoligotypage. Quatre cas de légionellose ont été diagnostiqués chez des patients ayant fréquenté le même service hospitalier sur une longue période : 1 cas en 2009, 1 cas en 2011 et 2 cas en 2014. Une souche était disponible pour les cas diagnostiqués en 2011 et 2014. Les souches présentaient les mêmes caractéristiques : ST 1, profil PFGE Paris, sous-groupe Philadelphia. Des souches environnementales isolées en 2009 et 2014 présentaient les mêmes caractéristiques. La méthode de spoligotypage a permis de confirmer la source de contamination : les 3 souches d'origine clinique (2009 et 2014) et les 2 souches environnementales (2009 et 2014) présentent le même spoligotype : SPL34. Parmi les 400 isolats ST 1 isolés dans toute la France et analysés en spoligotypage, seul un isolat issu d'une autre investigation présentait ce même spoligotype.

En 2015, cette technique n'a pas été utilisée.

Depuis le développement du WGS, la place du spoligotypage parmi les outils de typage est à préciser. Nous avons collaboré fin 2015 et au cours de 2016 avec le Public Health England pour évaluer l'apport du NGS dans l'investigation des cas, notamment hospitaliers, dus à des isolats ST1 (Sophia David^{1,2}, Baharak Afshar^{2,3}, Massimo Mentasti², Christophe Ginevra^{4,5}, Isabelle Podglajen⁶, Simon R. Harris¹, Victoria J. Chalker², Sophie Jarraud^{4,5}, Timothy G. Harrison² & Julian Parkhill¹⁸. Seeding and establishment of *Legionella pneumophila* in hospitals; implications for genomic investigations of nosocomial Legionnaires' disease, en cours de soumission)

- Evaluation de la technique MLVA pour le typage des souches de légionelles (2012 – 2013)

La méthode développée par l'Institut de Génétique et Microbiologie de Paris à Orsay et le Centre Européen d'Expertise et de Recherche sur les Agents Microbiens (CEERAM) à Nantes, est basée sur le polymorphisme de longueur de 12 VNTR et utilise une PCR multiplex suivie d'une migration électrophorétique en capillaire multi-couleur. Nous avons évalué cette méthodologie sur un ensemble de 200 souches représentatives de la diversité des souches rencontrées en France, isolées de patients non reliés épidémiologiquement et souches de patients reliés épidémiologiquement. Cette évaluation constituait une partie d'un projet coordonné par Pierre Le Cann (Département Santé Environnement Travail (DSET) et Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Environnement et Santé de Rennes, l'équipe Génome, Polymorphisme et Minisatellite (GPMS) de l'Institut de Génétique et Microbiologie (IGM ; UMR CNRS-Université) et l'Unité Mixte de Recherche 2724 Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses (GEMI), et financé par l'ANSES.

- Puces pour le génotypage de *Legionella pneumophila* sg1 (LegioType AS-1) (2011– 2014)

Une puce pour le génotypage de *Legionella pneumophila* sg1 a été développée par Christian Lück et Stefan Monecke (laboratoire de bactériologie de Dresden) en collaboration avec la société Clondiag (Peter Slickers et Ralf Ehricht). Cette puce contient 97 spots en quadruplet de cibles telles que des éléments génétiques variables, des gènes associés à la synthèse du LPS (Sérogroupe / monoclonal subgroup), des gènes du Core génome. La stabilité et la reproductibilité de la puce a été évalué par des analyses répétées indépendantes de 103 isolats incluant 80 souches de référence de la collection européenne EUL et 46 jeu de souches reliées épidémiologiquement entre elles. Un total de 600 autres souches Lp1 ont été analysées et ont permis d'identifier 27 complexes clonaux (CC) avec 85 sous-complexes et 22 singletons. L'indice de discrimination pour les souches étudiées dans cette étude était de 0,961. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le CNR Allemand. Nous avons analysé plus de 200 souches reliées et non reliées épidémiologiquement.

- LegioType AS-1: Rapid microarray-based genotyping of *Legionella pneumophila* Sg1 isolates. Petzold, Markus; Jarraud, Sophie; Ehricht, Ralf; Jacotin, Nathalie; Meyer, Thomas; Slickers, Peter; Ziegler, Albrecht; Monecke, Stefan and Lück, Christian, présentation affichée à ESGLI, Amsterdam, September 2016

- Séquençage de génomes entier (WGS, Whole Genome Sequencing) (2014-)

2014 : Premiers essais techniques pour mise en place du typage par séquençage du génome entier

Le séquençage de génome entier ouvre des perspectives particulièrement intéressantes pour le typage épidémiologique des *L. pneumophila*. Nous avons accès à une plateforme de séquençage haut débit (NGS) au niveau des hospices civils de Lyon. Sur cette plateforme, 2 technologies de NGS sont disponibles : illumina et lifetechnologies. Nos premiers essais ont consisté à séquençer un isolat avec les 2 technologies (illumina paired end 150bp vs ion torrent 400bp). L'analyse des résultats obtenus démontre une plus grande fiabilité des résultats obtenus avec la technologie illumina ; néanmoins, la technologie lifetechnologies permet de tester un nombre d'isolats plus faible et plus souple par run (96 isolats/run illumina, 1 à 50 isolats /run lifetechnologies).

Nous avons également développé, en collaboration avec l'équipe « Biométrie et Biologie Evolutive », UMR CNRS 5558-LBBE Lyon 1, un script permettant d'extraire les séquences des gènes utilisés pour le typage par séquençage multi locus de *L. pneumophila* (SBT). Ceci permet d'utiliser les séquences issues du NGS pour déduire les ST obtenus habituellement par PCR et séquençage Sanger.

2015 : Séquençage de 172 isolats de *Legionella*

Evaluation technique :

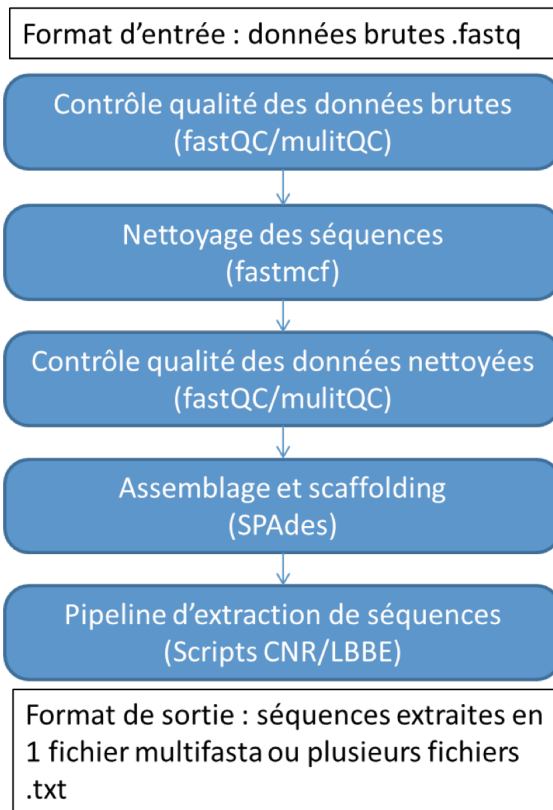
- Séquençage de 32 isolats avec la technologie Illumina Miseq PE 300bp avec préparation des banques par fragmentation mécanique (truseq & covaris),
- Séquençage de ~140 isolats avec la technologie Illumina NextSeq PE150bp avec fragmentation enzymatique (Nextera XT).
- Comparaison des 2 méthodes (Coût, qualité des résultats, faisabilité)
- Mise en place de l'automatisation de la préparation des banques sur automates de pipetage Caliper (PerkinElmer). Les étapes Pré-amplification sur l'automate Sciclone (Préparation plaques d'index, d'ADNg, Tagmentation et préparation du mix PCR) et des étapes post amplification sur Automate Zephir (PCR clean-up, Normalisation des banques sur billes).

Analyse bioinformatique :

- mise en place d'un pipeline d'analyse incluant contrôle Qualité, filtration sur des critères de qualité, assemblage filtration de l'assemblage sur des critères de qualité et extraction des données de SBT (Figure 19).
- Evaluation du logiciel de wgMLST seqSphere
- Evaluation du logiciel de ribosomal MLST (<http://rmlst.org/>)
- Installation pour évaluation avec la DSII des HCL du logiciel BigsDB permettant de générer et de gérer des bases de données de séquences (incluant NGS) ainsi que la génération de wgMLST.
- Evaluation de divers logiciel en vue de l'intégration dans un futur pipeline plus complexe.
- Evaluation de logiciels pour l'analyse de SNPs : La suite harvest (Parsnp et gngnr), bwa et Bowtie2 sous un environnement Galaxy.

Ces évaluations et mises en place ont été réalisées conjointement avec le CNR des staphylocoques.

A. Pipeline global : assemblage + extraction



B. Pipeline extraction : principe

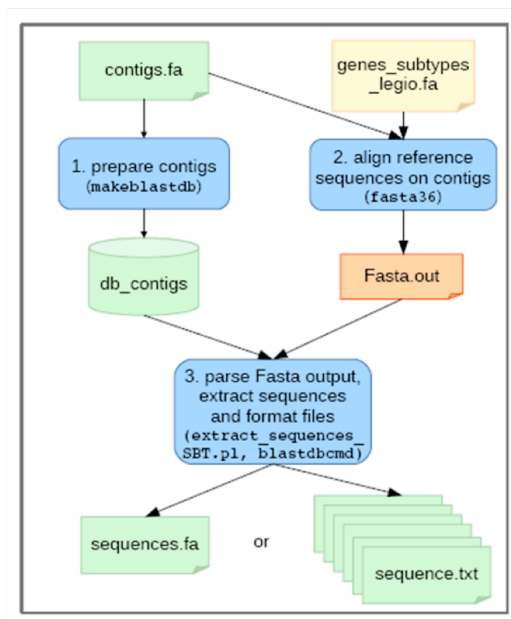


Figure 19. Pipeline d'assemblage des séquences NGS et d'extraction des séquences d'intérêt.

3.4.1.4.2- Evolution des activités de typage

* Evolution des méthodes

Depuis 2008, toutes les souches d'origine clinique reçues au CNR des légionelles et les souches d'origine environnementale reçues pour comparaison avec une souche clinique, sont systématiquement typées par 3 méthodes :

- utilisation d'anticorps monoclonaux (mAbs) car le sous-groupe est couramment utilisé au niveau européen;
- *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) car jusqu'à alors méthode la plus discriminante (tableau 8)
- amplification et séquençage nucléotidique (« Sequence Based Typing », SBT) de 7 gènes sélectionnés, qui est la méthode de référence européenne.

Pour les souches *L. pneumophila* séro-groupe non 1, seules les techniques SBT et PFGE peuvent être appliquées. Pour les souches *L. non pneumophila*, seule la méthode PFGE peut être appliquée mais celle-ci n'a pas été développée pour toutes les espèces. Le pouvoir discriminant de cette méthode n'est pas clairement déterminé pour ces espèces.

Les souches *L. pneumophila* séro-groupe 1 ST1/pulsotype Paris peuvent être typées par spoligotyping.

Tableau 8. Pouvoir discriminant des méthodes de typage de *Legionella pneumophila* sg 1

Methodes	Pouvoir discriminant (D)	Référence
PFGE	0.990	Fry et al., 1999
SBT	0.940	Gaia et al., 2005
SBT + Mab	0.980	Gaia et al., 2005
Spoligotyping	0.797	Ginevra et al., 2011

Whole genome mapping	0.870	Bosch et al., 2015
cgMLST	0.990 à 0.999	David et al. 2016
SNPs based mapping	0.999	David et al. 2016

L'évolution des analyses réalisées depuis 2012 est présentée tableau 2.

En 2015, 604 isolats ont été analysés en PFGE, 429 en SBT, 584 par Ac monoclonaux et 229 prélèvements par Nested SBT. 140 souches ont été analysées par WGS mais dans un objectif de mise au point méthodologique.

Nous pensons à court terme remplacer les analyses de SBT et en grande part de PFGE par le WGS.

* Place de la Nested-SBT

Lorsque la culture et la co-culture sont négatives, la Nested-SBT peut être réalisée directement sur le prélèvement.

De 2012 à 2015, 618 prélèvements ont été analysés par Nested-SBT. Ces prélèvements appartiennent pour la plupart à des patients pour lesquels le diagnostic de légionellose a été posé par la détection d'antigènes urinaires et plus rarement par une PCR positive pour *L. pneumophila*.

Au cours de ces 4 dernières années, nous avons obtenu un « Sequence Type » (ST) pour 58 (9,4%) prélèvements. Pour 236 (38.2%) autres prélèvements, au moins 1 gène sur les 7 gènes analysés a été amplifié (Tableau 9).

Depuis 2013, pour plus de 50% des prélèvements, aucun allèle n'est obtenu. Depuis ces dernières années, nous avons amélioré la sensibilité des techniques culturales pratiquées au CNR. La négativité de la Nested-SBT sur des prélèvements pour lesquels la culture est négative suggère que ces prélèvements présenteraient un faible inoculum bactérien.

Cette technique qui présente de faible performance reste utile pour les investigations notamment pour distinguer deux isolats. Cette méthodologie doit être limitée aux cas pour lesquels l'identification de la source de contamination est importante. Son intérêt est décrit dans l'investigation de cas groupés (Chapitre 3.3.1.7).

Tableau 9. Synthèse des résultats obtenus par la technique de Nested-SBT sur prélèvements pulmonaires.

Année	Nombres de gènes pour lesquels un résultat est disponible								Nombre total de prélèvements
	7 (%)	6	5	4	3	2	1	0 (%)	
2012	16 (14,3)	6	6	2	8	4	20	50 (44,6)	112
2013	16 (11,4)	6	4	5	7	11	11	80 (57,1)	140
2014	15 (10,5)	5	5	6	4	6	18	84 (58,7)	143
2015	11 (4,9)	13	13	11	10	19	36	110 (49,3)	223

3.4.1.5- Caractérisation des souches et description des ST responsables de la majorité des cas de légionellose en France

- **Sous-groupage des souches *L. pneumophila* séro-groupe 1**

La proportion des différents sous-groupes de *L. pneumophila* séro-groupe 1 est relativement constante suivant les années avec une proportion importante des sous-groupes France / Allentown, Philadelphia et Knoxville (Figure 20, Tableau 10). Ces données sont similaires pour l'ensemble des pays européens.

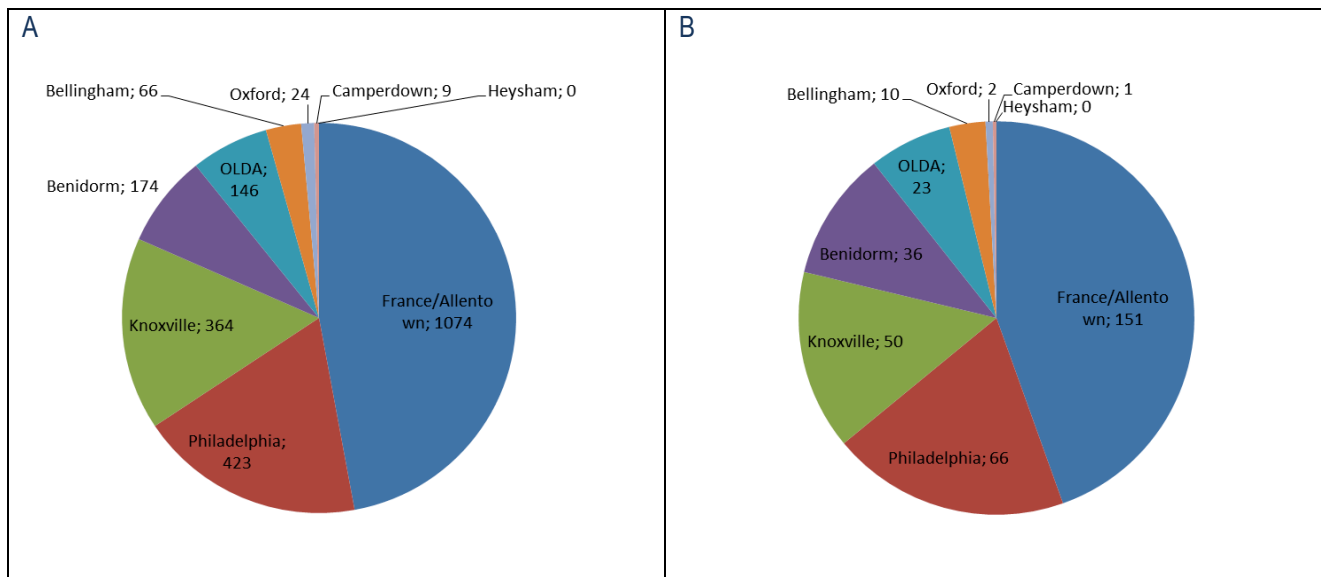


Figure 20. Répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* sérotype 1 (A) parmi les 2280 souches isolées entre 2008 et 2015 et (B) parmi les 346 souches isolées en 2015..

Tableau 10. Répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* sérotype 1 parmi les 2280 souches isolées entre 2008 et 2015.

Sous Groupe de Lp1	Nombre de souches	Pourcentage (%)
France/Allentown	1074	47.1%
Philadelphia	423	18.6%
Knoxville	364	16.0%
Benidorm	174	7.6%
Sous total MAb 3/1 +	2035	89.3%
OLDA	146	6.4%
Bellingham	66	2.9%
Oxford	24	1.1%
Camperdown	9	0.4%
Heysham	0	0.0%
Sous Total MAb3/1 -	245	10.7%
TOTAL	2280	100.0%

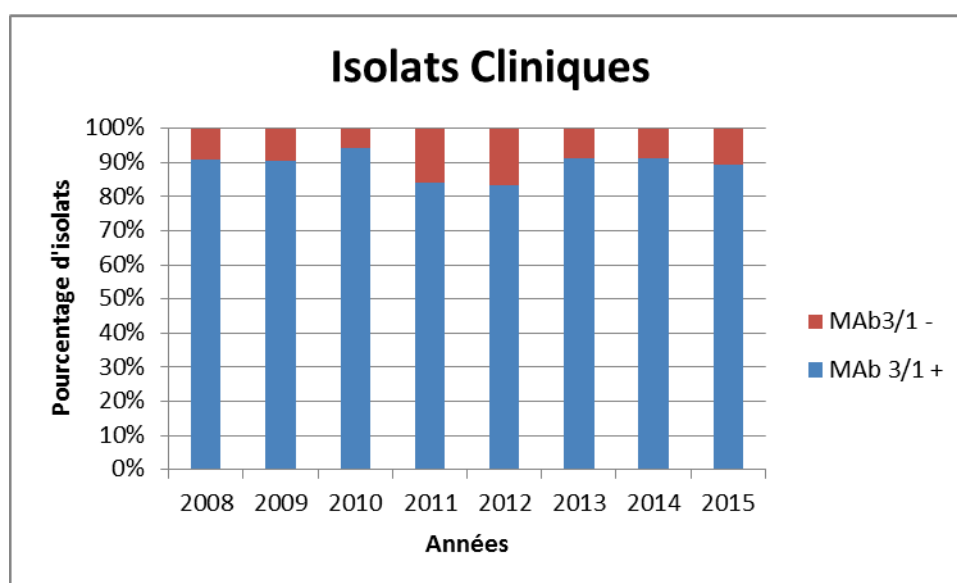
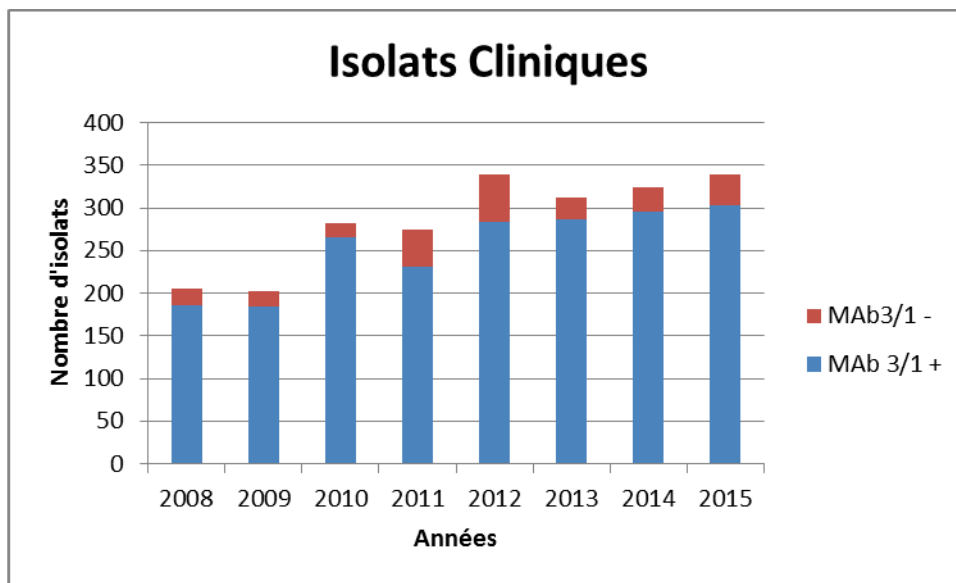


Figure 21. Répartition des 2 sous-groupes Mab 3/1 (+) et Mab 3/1 (-) de *L. pneumophila* sérotype 1 parmi les 2280 souches isolées entre 2008 et 2015.

- **PFGE**

L'analyse systématique par PFGE des souches d'origine clinique depuis 15 ans montre une diminution chaque année de la proportion de souches sporadiques par rapport à l'ensemble des souches analysées (Figure 22). Cette diminution est liée en grande part à l'augmentation du nombre de profils présents dans notre base de données.

La caractérisation du caractère « sporadique » d'une souche est exacte lors de l'analyse et lors de la comparaison à la base de données mais évolue au cours du temps du fait de l'analyse des souches suivantes. Il est donc extrêmement difficile de mettre à jour ces données. La méthode PFGE a surtout une grande utilité lors des investigations de cas car c'était la méthode la plus discriminante disponible avant l'avènement du WGS. Pour l'analyse plus globale de la population des *Legionella* présentes en France, la méthode SBT était jusqu'alors utilisée.

La Figure 22 montre l'augmentation importante des souches dont le profil PFGE est déjà répertorié. Ces données encouragent à utiliser le WGS.

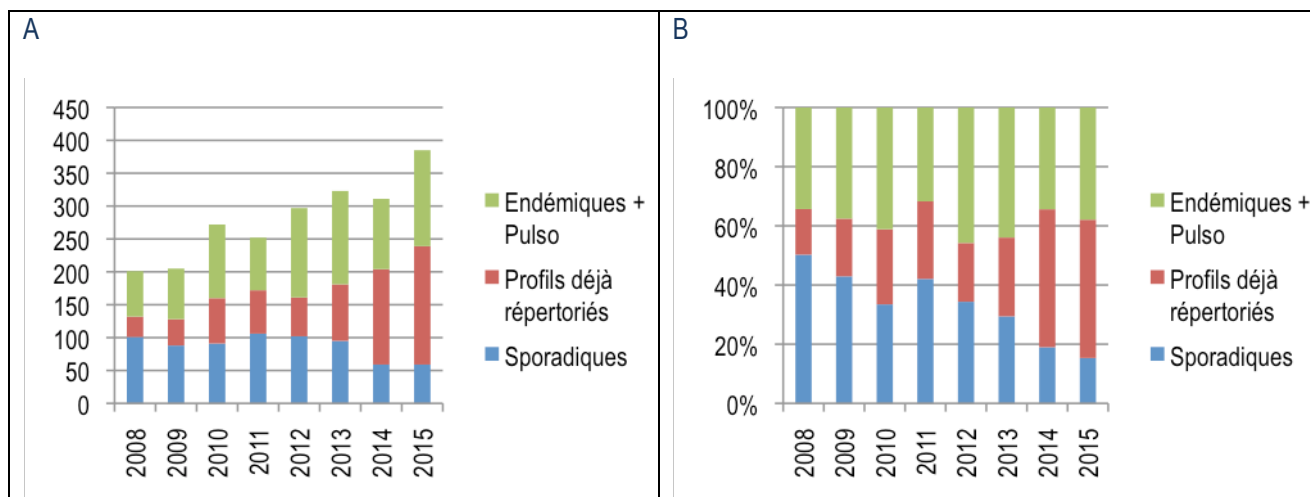


Figure 22. Evolution du nombre de souches présentant un pulsotype sporadique, endémique ou un profil déjà répertorié dans la base de données de pulsotypes des souches cliniques du CNR, (A) nombre de souches, (B) pourcentage par rapport à l'ensemble des souches d'origine cliniques analysées.

- **Sequence Based Typing (SBT)**

En 2015, l'ensemble des Lp1 étudiées appartenait à 107 Sequence Type (ST) différents. Les ST les plus fréquemment retrouvés sont indiqués dans le tableau 11 et Figure 23. **Plus de 53% des souches isolées de patients appartiennent à 8 ST : ST23, ST47, ST1, ST62, ST259, ST40, ST20, ST701.**

Ces données montrent qu'une large proportion de cas est due à un petit nombre de STs communs (ou profil PFGE comme décrits ci-dessus). Ces STs peuvent être communément isolés dans l'environnement (comme le ST1) ou très rarement isolés dans l'environnement (comme le ST47).

Une analyse plus précise de la distribution des différents STs a été réalisée sur une période de 8 ans de 2008 à 2015 (Tableau 11).

Tableau 11. Nombre de souches appartenant aux 23 STs les plus représentés parmi les souches cliniques isolées entre 2008 et 2015 *.

ST	Années									TOTAL	%
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015			
23	39	39	53	55	50	55	55	68	414	19%	
1	19	24	24	17	25	29	27	41	206	9%	
47	23	15	31	29	27	26	17	20	188	8%	
62	5	12	13	17	12	18	15	15	107	5%	
146	6	14	14	5	11	17	5	17	89	4%	
259	3	2	14	2	16	8	18	10	73	3%	
20	7	10	8	8	8	7	12	9	69	3%	
40	5	10	10	3	6	8	11	11	64	3%	
82	6	3	9	16	9	7	8	7	65	3%	
42	1	3	4	4	8	10	5	12	47	2%	
701	0	6	4	4	6	7	11	6	44	2%	
444	4	2	3	5	6	4	12	3	39	2%	
9	5	1	4	3	11	3	5	7	39	2%	

94	3	3	7	0	7	9	8	2	39	2%
48	2	5	2	8	3	3	5	7	35	2%
107	11	3	3	0	2	5	1	5	30	1%
44	1	3	3	3	4	4	3	6	27	1%
75	4	2	0	4	4	3	5	5	27	1%
96	2	3	5	4	5	4	0	4	27	1%
65	4	0	2	2	3	3	6	5	25	1%
37	3	0	0	2	1	2	10	4	22	1%
224	2	1	4	2	3	3	3	4	22	1%
435	4	1	5	2	2	4	4	1	23	1%
Autre	47	46	53	56	71	73	70	84	500	23%
TOTAL	206	208	275	251	300	312	316	353	2221	100%

*Ces données sont issues des souches *L. pneumophila* reçues au CNR aux dates indiquées. Les chiffres indiqués peuvent être différents des chiffres du tableau 5 qui prend en compte les souches *L. pneumophila* et *L. non pneumophila* isolées de patients pour lesquels la date de début des signes se situe en 2015 et non les souches reçues et analysées au CNR en 2015.

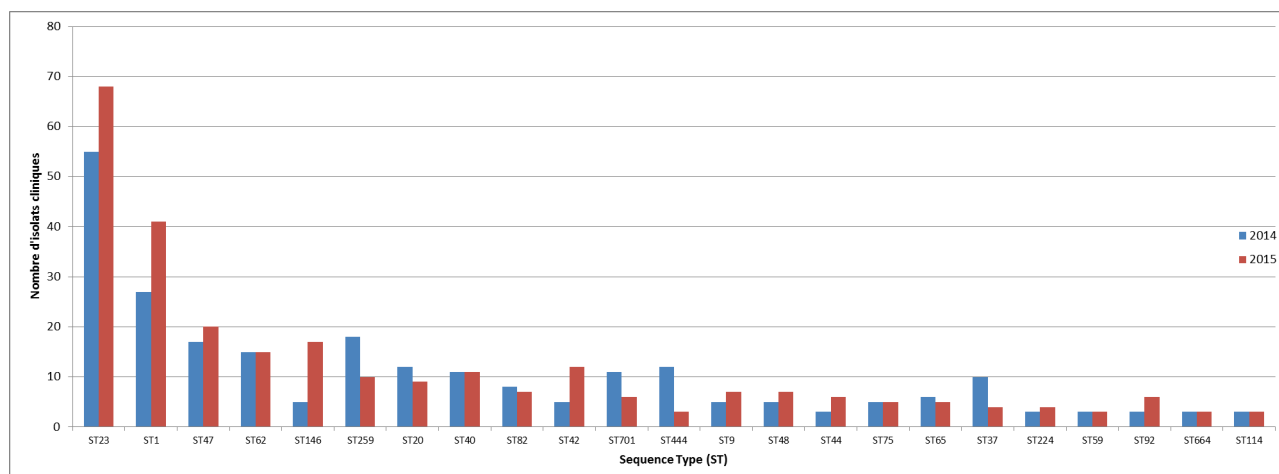


Figure 23. Distribution des souches des 23 ST prédominants en France parmi les isolats cliniques en 2014 et 2015

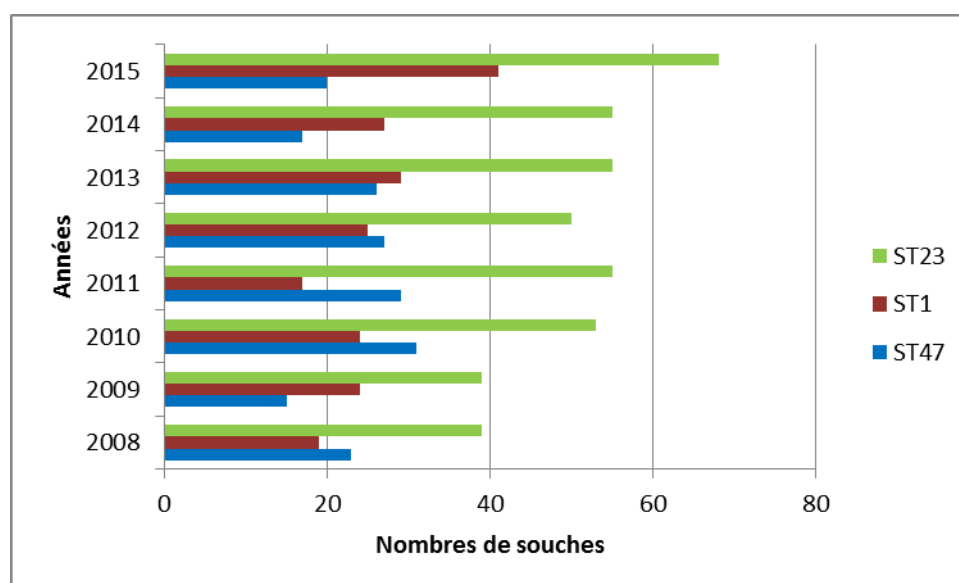


Figure 24. Evolution de la distribution des isolats cliniques des 3 ST majoritaires (ST1, ST23, ST47) en France de 2008 à 2015.

L'analyse des évolutions montre en 2015 une augmentation des 3 ST majoritaires (ST1, ST23, ST47), plus légère pour le ST47 (Figure 24).

* Emergence de différents ST en France

Nous observons l'augmentation du nombre d'isolats pour certains STs (Figure 17) dont le ST62 (très présents en Europe), ST146, S259, ST20, ST82, ST40, ST42 et ST701 (Figure 25).

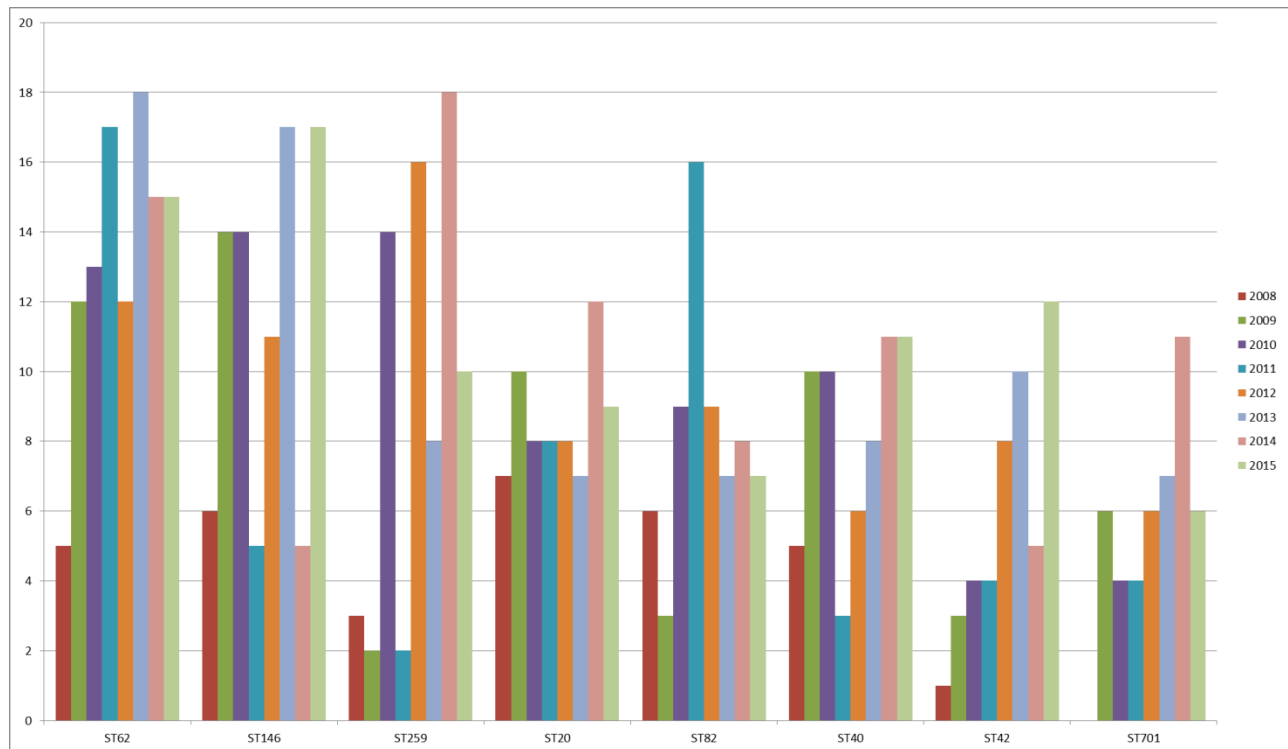


Figure 25. Evolution de la distribution des souches des ST émergents en France de 2008 à 2014.

Parmi ces STs, nous nous sommes particulièrement intéressés aux souches ST701 et STs apparentés (Single locus variant, slv et double locus variant, dlv et triple locus variant que sont les ST1904, 2116, 2130, 2131 et 259) car ils semblent émergents ces dernières années (Figure 26). Pour ces souches nous avons identifié la présence de protéines de pompe d'efflux présentes uniquement chez ces souches et chez les souches ST1 largement répandues dans l'environnement (chapitre 3.6). Ces souches ST701 et STs apparentés sont quant à elles très peu isolées dans l'environnement jusqu'à maintenant.

Le séquençage du génome de ces souches a montré qu'elles appartenait à une sous-espèce de *L. pneumophila* autre que *Legionella pneumophila* sous espèce *pneumophila* responsable selon les méthodes utilisées jusqu'à maintenant comme la sous espèce très largement prédominante parmi les cas de légionellose (chapitre 3.6).

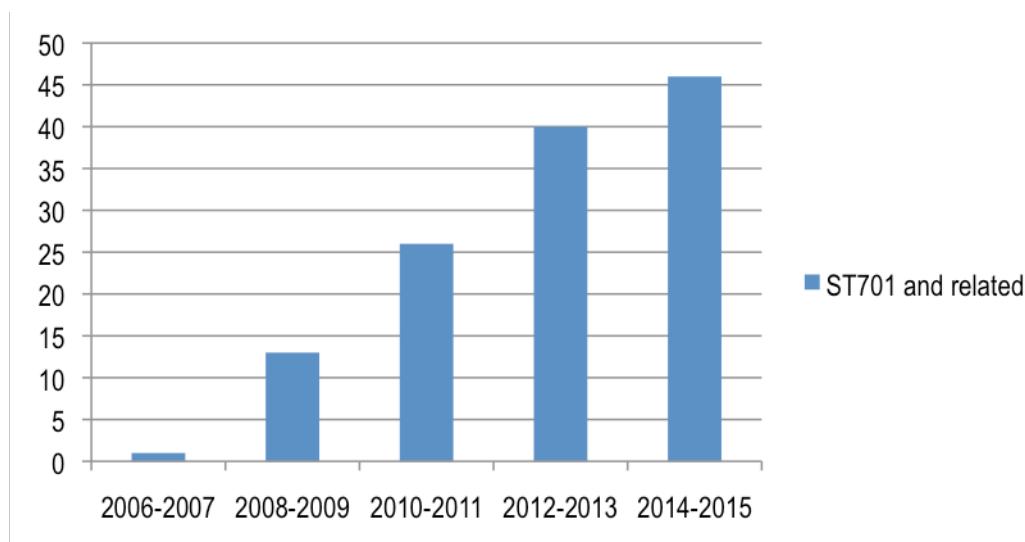


Figure 26. Evolution du nombre de souches ST701 et apparentés (ST1904, 2116, 2130, 2131 et 259) de 2006 à 2015

3.4.1.6- Contribution à l'investigation des sources de contamination pour les cas sporadiques

En 2015, les données nationales de l'InVS rapportent que la part des expositions à risque rapportées est supérieure aux années précédentes notamment celle concernant les voyages (Tableau 12).

Tableau 12. Expositions à risque parmi les cas de légionellose survenus en France, 2013-2015 (données InVS)

Expositions*	2013 (1262)		2014 (1348)		2015 (1389)	
	n	%	n	%	n	%
Hôpital	86	7	72	5	108	8
Maison de retraite	59	5	63	5	55	4
Station thermale	6	1	3	0	6	0
Voyage	239	19	259	19	304	22
Hôtel-camping	145	12	161	12	177	13
Résidence temporaire ^a	53	4	45	3	84	6
Autres types de voyage ^{b *}	41	3	53	4	43	3
Autres ^c	75	6	103	8	108	8
Total des cas ayant au moins une exposition	465	37	500	37	581	42

* Rapportées au nombre total de cas

^a Location, chambre d'hôte, gîte, maison secondaire, logement chez amis ou famille,

^b Sans précision de lieu et type de logement

^c Etablissement recevant du public (piscine, stade ...), exposition professionnelle, appareil à apnée du sommeil, etc...

Nous rapportons ici les investigations microbiologiques menées sur les cas de 2008 à 2014 lors d'une étude réalisée avec l'InVS ainsi que les résultats des investigations réalisées en 2015.

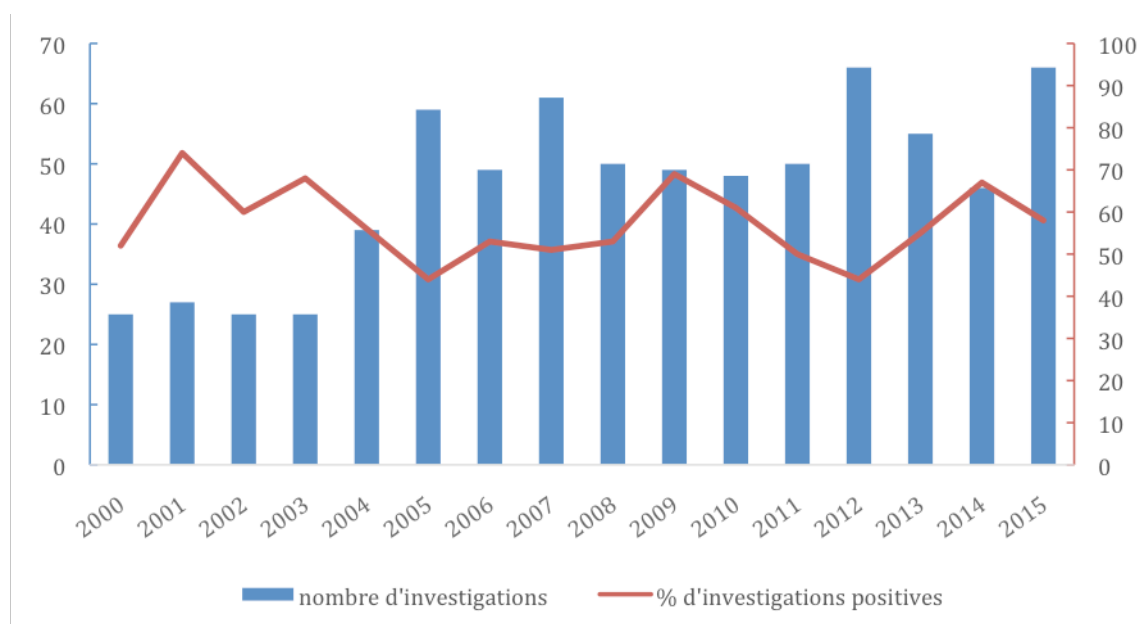
De 2008 à 2014, parmi les 9068 cas de légionellose déclarés, 349 (3,9 %) ont fait l'objet d'une investigation microbiologique avec comparaison entre la souche clinique isolée d'un prélèvement respiratoire et une ou plusieurs souches environnementales. **En 2015, parmi les 1386 cas de légionelloses déclarés, 63 ont fait l'objet d'une investigation, soit 4,5 %.**

De 2008 à 2014, les cas pour lesquels une investigation microbiologique a été réalisée représentaient 18 % des cas pour lesquels une souche clinique avait été isolée (1948 souches cliniques isolées, soit une souche pour 22 % des cas déclarés). **En 2015, 346 souches cliniques ont été isolées soit une souche pour 25 % des cas déclarés. 63 cas ont bénéficié d'une investigation microbiologique, soit 18,2 % des cas pour lesquels une souche clinique était isolée.**

Les 63 cas investigués en 2015 ont entraîné la réalisation de 66 comparaisons microbiologiques. Pour un des cas, nous avons reçu des souches environnementales de 2 hôpitaux différents, pour un autre, nous avons reçu des souches environnementales de 2 lieux de voyage différents et enfin pour un troisième cas, nous avons reçu des souches environnementales à la fois de son domicile et de fontaines.

Le nombre d'investigations réalisées augmente régulièrement depuis 15 ans passant d'une trentaine par an dans les années 2000 à plus de 50 par an depuis 2005. En 2015, le nombre d'investigations réalisées avait nettement augmenté par rapport à 2014 mais se rapprochait des chiffres des années précédentes (2012 et 2013). En parallèle, le nombre d'investigations positives, c'est-à-dire de cas où la souche clinique et la ou les souches environnementales présentent les mêmes caractéristiques épidémiologiques, avait légèrement augmenté en 2015 par rapport à 2014. Néanmoins, rapporté au nombre d'investigations réalisées, le pourcentage d'investigations positives était plus faible en 2015 (58 %) qu'en 2014 (67 %) (Figure 27).

Figure 27. Evolution du nombre d'investigations et du pourcentage d'investigations positives depuis 2000



De 2008 à 2014, les souches environnementales comparées avec une souche clinique provenaient pour 24 % d'entre elles du domicile du patient, pour 23 % de TAR (tours aéro-réfrigérantes), pour 22 % d'hôpitaux, pour 14 % d'établissements touristiques et pour 17 % d'un lieu autre qui pouvait être un EHPAD, un lieu de travail, une piscine, une thalasso,

Le pourcentage d'investigations positives entre 2008 et 2014 était de 54 % avec une variation en fonction de l'origine de la souche environnementale. En effet, lorsque la souche comparée provenait d'un hôpital, 71 % des investigations étaient positives alors que lorsque la souche provenait d'une TAR, seules 9 % des investigations étaient positives (Tableau 13).

Tableau 13. Investigations épidémiologiques réalisées entre 2008 et 2014

Origine de la souche environnementale	Total des investigations		Investigations positives	
	N	%	N	%
Hôpitaux	78	22	55	71
Domicile	88	24	59	67
Tourisme	52	14	35	67
Autre	61	17	39	64
TAR	81	23	7	9
TOTAL	360		195	54

En 2015, les souches environnementales reçues provenaient essentiellement d'hôpitaux, de domicile et de lieux autres qui étaient des EHPAD, des lieux de travail, des piscines, des thalassos, un gymnase, une base aéronautique, un cabinet de kinésithérapeute, une fontaine publique et une fontaine sur un lieu de travail. Les TAR ne représentaient que 11 % des investigations réalisées.

En 2015, le pourcentage d'investigations positives était de 58 % avec toujours une valeur très élevée pour les investigations avec une souche environnementale hospitalière (82 %). Le pourcentage d'investigations positives avec une souche environnementale provenant du domicile était lui plus faible en 2015, seulement 36 % contre 67 % sur la période précédente (Tableau 14).

Tableau 14. Investigations épidémiologiques réalisées en 2015

Origine de la souche environnementale	Total des investigations		Investigations positives	
	N	%	N	%
Hôpitaux	17	26	14	82
Domicile	14	21	5	36
Tourisme	10	15	7	70
Autre	18	27	12	67
TAR	7	11	0	0
TOTAL	66		38	58

Parmi les 38 investigations positives de 2015, 12 souches (32 %) étaient des souches endémiques de pulsotype « Paris » pour 7 d'entre elles, « Louisa » pour 4 et Belfort pour 1. Les souches endémiques représentaient également 40 % des investigations positives entre 2008 et 2014. Ces profils endémiques étant très fréquents, l'investigation microbiologique positive ne permet pas à elle seule de conclure quant à l'origine de la contamination.

Les autres profils retrouvés en 2015 étaient : 2 pulsotypes A, 1 pulsotype F, 31 souches avec un profil déjà répertorié dans notre base de données et 8 sporadiques. Une des investigations positives concernait un cas à *L. pneumophila* sérotype 6.

3.4.1.7- Contribution à l'investigation des cas groupés

Les précisions sur les investigations des cas groupés de 2012 à 2014 sont présentées en Annexe 8. Aucun épisode de cas groupés ou suspicion de cas groupés confirmés bactériologiquement avec plus de 10 cas n'a été détecté depuis 2007.

En 2015, plusieurs épisodes de suspicion de cas groupés ont été explorés (Voir ci-dessous). Une seule des investigations microbiologiques a permis de confirmer le caractère groupé des cas et a identifié la source de contamination. Les autres investigations montrent une augmentation géographique du nombre de cas mais contaminés avec des souches différentes ou avec des souches endémiques ne permettant pas de conclure quant au caractère groupé et à la source de contamination.

L'analyse d'un nombre plus conséquent de souches environnementales sera un point important à investiguer dans les

prochaines années pour vérifier que ces souches différentes ne sont pas présentes dans un même environnement. Le typage de première intention par le Maldi-Tof devrait permettre de répondre à ces questions (chapitre 7.3.5). Pour les souches endémiques, le WGS, plus discriminant devrait également permettre dans certains cas de s'assurer du caractère groupé des cas. Enfin ces investigations montrent que la méthode Nested-SBT a été utile pour plusieurs de celles-ci.

*** Cas groupés de légionellose en Franche Comté**

Entre juillet et septembre 2015, 15 cas de légionellose ont été diagnostiqués en Franche-Comté. Sur ces patients, 8 souches Lp1 ont pu être isolées. Trois souches présentaient des caractéristiques épidémiologiques identiques de type Louisa, ST23, sous-groupe France/Allentown. Compte-tenu du caractère endémique de ces souches, il n'a pas été possible de conclure à un lien éventuel entre ces cas. Les autres souches présentaient une grande hétérogénéité de profil PFGE et étaient ST40 ou ST224 et une souche présentait un pulsotype D, ST94 et sous-groupe Knoxville. Pour les 7 autres patients, la culture et co-culture des prélèvements pulmonaires étant restées négatives, ces prélèvements ont été analysés par Nested-SBT. Ceci a permis d'identifier un ST complet de type ST94 chez un patient. Les autres analyses par Nested-SBT n'ont pas permis d'obtenir des ST complets (de 0 à 3 gènes identifiés). Ainsi l'analyse bactériologique de ces 15 patients n'a pas permis de montrer de lien épidémiologique formel entre l'ensemble des cas.

*** Cas groupés dans la région de Montpellier**

Pendant l'été 2015, 5 cas légionellose ont été diagnostiqués dans la région de Montpellier. Les 4 souches cliniques disponibles présentaient toutes des caractéristiques différentes avec des profils PFGE déjà répertoriés dans notre base de données, et des ST 42 ou ST 2106. Pour le dernier patient, aucune souche n'ayant pu être obtenue, le prélèvement a été analysé par Nested-SBT et a permis d'amplifier un seul gène (*pilE*) dont l'allèle n'est compatible ni avec un ST 42 ni un ST 2106. Enfin nous avons reçu deux souches environnementales provenant de prélèvements d'eaux réalisés au niveau de la fontaine des 3 grâces et de la fontaine de l'esplanade Gaumont à Montpellier pour comparaison avec les patients. Ces souches environnementales présentaient des caractéristiques identiques avec la souche d'un des patients.

*** Cas groupés de légionellose dans la région de Mulhouse**

Trois cas de légionellose ont été diagnostiqués dans la région de Mulhouse en juin 2015. Sur ces trois cas, une souche Lp1 a pu être isolée et présentait un pulsotype F, ST 259 et sous-groupe Philadelphia. L'analyse du prélèvement par Nested-SBT du deuxième patient a permis l'amplification de 3 gènes, dont les allèles n'étaient pas compatibles avec le ST 259. Aucune enquête environnementale n'a été faite pour ces cas.

*** Cas groupés dans le département du Loiret**

Trois cas de légionelloses ont été diagnostiqués dans le département du Loiret (45). Sur ces 3 cas, seul un patient avait un prélèvement pulmonaire disponible et qui a été analysé par Nested-SBT positif pour 5 gènes. Les deux autres patients ont seulement été analysés par sérologie ou PCR sur sérum. Devant l'absence de souches ou de ST disponibles, le lien entre ces cas groupés n'a pas pu être prouvé et aucune enquête environnementale n'a été effectuée.

*** Cas groupés dans la région de Toulouse**

Quatre cas de légionellose ont été diagnostiqués dans la région de Toulouse par antigénurie positive. Sur ces 4 patients, les 3 souches isolées présentaient un profil identique (profil PFGE déjà identifié dans la base de données du CNR, ST92 et sous-groupe Knoxville) suggérant une origine commune de contamination. La souche du quatrième patient présentait, elle, un profil différent (PFGE différent, ST 65 et sous-groupe Benidorm). Une enquête environnementale a été réalisée et a permis l'isolement de souches environnementales à partir de prélèvements de la TAR de Yéo International à Toulouse. Cependant, ces souches présentaient des caractéristiques différentes des souches cliniques des 4 patients, ne permettant pas d'identifier la source de contamination.

*** Cas groupés dans la région de Nancy**

Trois cas de légionellose ont été diagnostiqués dans la région de Nancy entre avril et juin 2015. Deux souches Lp1 étaient des ST1 mais présentaient des profils PFGE différents (profil Paris, ST1, et profil différent mais déjà répertorié dans la base de données). La Nested-SBT réalisé sur le troisième patient concluait également à un ST1. Suite à des enquêtes environnementales, ces souches ont été comparées à des souches environnementales provenant d'une TAR de la brasserie Champigneulle, qui se sont avérées différentes des souches cliniques. Devant une possible origine nosocomiale pour un patient, des prélèvements d'eau de sa chambre ont permis d'isoler des Lp1 ST1 avec un profil identique à celui du patient, suggérant une source de contamination hospitalière pour ce cas.

*** Cas groupés au CHU de Perpignan**

Trois cas de légionellose ont été diagnostiqués au CHU de Perpignan entre mai et juin 2015. Aucune souche n'a pu être isolée pour ces patients. L'analyse des prélèvements pulmonaires par Nested-SBT a permis d'obtenir les allèles de 1 à 5 gènes suivant les patients, qui présentaient tous des allèles identiques. Cependant, ces données étaient insuffisantes pour conclure à une éventuelle source de contamination commune entre ces patients.

* **Cas groupés dans l'Indre**

Deux cas de légionelloses ont été diagnostiqués chez des patients ayant séjourné dans le même hôtel de Pouligny-Notre-Dame (Indre). Seule une souche Lp1 était disponible pour un patient et présentait un profil endémique de type Louisa, ST23. Le prélèvement du deuxième patient a été analysé par Nested-SBT et a permis l'amplification de 5 gènes dont les allèles étaient compatibles avec un ST23. L'enquête environnementale a permis d'isoler des souches à différents lieux de l'hôtel : douchette de la chambre, douche du clubhouse, douche du hall des bassins. Toutes ces souches présentaient un profil identique à celui de la souche clinique suggérant cette source de contamination pour au moins ce cas. Ainsi ceci semble être en faveur de cette source de contamination pour ces patients. Cependant, le caractère endémique des souches Louisa ST 23 ne permet pas de conclure.

* **Cas groupés dans un quartier de Chambéry**

Trois cas groupés de légionellose ont été diagnostiqués entre juin 2014 et novembre 2015 chez des patients résidants dans deux immeubles proches dans le quartier Cassines au nord de la gare de Chambéry. Pour 2 de ces cas, des souches Lp1 ont été isolées et présentaient des caractéristiques identiques, même profil PFGE mais déjà identifié dans notre base de données, ST62, sous-groupe Knoxville. Pour le troisième patient, une analyse par Nested-SBT a permis d'identifier 6 gènes sur 7, le profil allélique était compatible avec un ST62. Quatre souches environnementales Lp1 isolées de prélèvements d'eau chaude sanitaire réalisés au niveau de l'immeuble où résidaient deux des patients présentaient des caractéristiques identiques aux souches cliniques. Au vu de ces résultats microbiologiques, le domicile pourrait être la source de contamination de ces patients. Cependant ce profil de souche isolé pour la première fois en 2014 et est depuis fréquent et émergent sur l'ensemble de la France.

* **Cas groupés chez un couple dans le Bas-Rhin**

Deux cas de légionellose ont été diagnostiqués chez un couple résidant dans le Bas-Rhin en décembre 2015. Seule une souche a pu être isolée, qui était ST44, Profil PFGE déjà répertorié dans notre base de données et sous-groupe France/Allentown. Aucune souche n'a pu être obtenue pour la femme de ce patient, et l'analyse par Nested-SBT n'a permis l'amplification d'aucun des gènes analysés. Une enquête environnementale a permis d'isoler 3 souches à partir de l'eau chaude d'un SPA d'un cabinet de kinésithérapie-Balnéothérapie fréquenté par le couple, qui présentaient des caractéristiques identiques à celles de la souche du mari.

* **Cas groupés dans un club Vacancier**

Plusieurs cas de légionellose ont été diagnostiqués chez des patients ayant fréquenté le club Vacancier des Issambres dans le Var (83) entre 2013 et 2015. Nous avons reçu les prélèvements de deux patients mais seule une souche a pu être isolée. Cette souche présentait un Profil PFGE déjà répertorié dans notre base de données, une ST62 et un sous-groupe Knoxville. L'analyse par Nested-SBT du second patient a permis d'identifier des allèles compatibles avec un ST62. Une enquête environnementale a permis d'obtenir une souche à partir de prélèvements d'ECS au niveau de la chambre du patient, souche identique à celle isolée chez le patient.

* **Cas groupés en Guadeloupe**

Trois cas de légionellose ont été diagnostiqués en Guadeloupe. Seule une souche Lp1 a pu être isolée pour un patient et présentait des caractéristiques épidémiologiques de type profil PFGE déjà répertorié, ST42 et sous-groupe France/Allentown. Les prélèvements des deux autres patients ont été analysés par Nested-SBT, et un seul présentait des allèles compatibles avec un ST42. Devant le peu de données disponible pour ces cas, il n'a pas été possible de conclure formellement quant au caractère groupés de ces trois cas.

3.4.1.8- Etudes concourant à la surveillance (2012 – 2015)

3.4.1.8.1- Surveillance de la légionellose en France, en collaboration avec l'InVS

*** Participation à l'étude portant sur l'exhaustivité du système de surveillance des cas de légionellose en France**

Cette étude avait pour objectif d'estimer le nombre de cas de légionellose diagnostiqués en France en 2010 et l'exhaustivité régionale de la déclaration obligatoire. En effet des disparités régionales d'incidence marquées par un gradient ouest-est ont été constatées. De nombreuses hypothèses ont été discutées pour expliquer ces variations d'incidence : variation réelle du nombre de cas, disparité régionale du diagnostic de la maladie, disparité temporelle du taux de déclaration par les médecins et biologistes ou combinaison de ces différents phénomènes.

Deux sources, la notification des cas à l'InVS et l'interrogatoire des laboratoires ont été utilisées pour cette étude capture-recapture pour estimer le nombre de légionellose et l'exhaustivité de la notification des cas au niveau national et régional en 2010 en France. Le taux d'incidence était de 2,7 pour 100 000 habitants. L'exhaustivité de la DO était de 88.5% [95% IC: 88.0 to 89.0] alors qu'elle était de 10% en 1995 et 33% en 1998. Elle variait par région de 70% à 100% mais l'analyse des données confirme que le gradient ouest-est observé n'est pas lié à une disparité régionale de notification. Des études écologiques et environnementales sont donc nécessaires pour mieux comprendre des variations spatiales observées.

- Campese C, Jarraud S, Sommen C, Maine C, Che D. Legionnaires' disease in France: sensitivity of the mandatory notification has improved over the last decade. **Epidemiol Infect** 2013:1-6.

* Pratiques des laboratoires pour le diagnostic de la légionellose en France en 2010

Cette étude réalisée auprès des laboratoires avait également pour but de préciser les pratiques diagnostiques en 2010, de 423 laboratoires hospitaliers interrogés (à l'exclusion du sérodiagnostic). Deux questionnaires portant sur les activités de diagnostic et sur les résultats du laboratoire en 2010 ont été envoyés. Parmi ceux-ci 57 laboratoires (13,5%) n'ont réalisé aucune analyse en 2010. Les 345 laboratoires interrogés ayant répondu à l'ensemble du questionnaire pratiquent tous la détection des antigènes urinaires, 50% la culture et 8% la PCR (cette méthode n'étant pas encore incluse dans les critères de définition des cas). Sur les 160 000 tests urinaires réalisés en 2010, 0,87% étaient positifs.

- Campese C*, Jarraud S, Che D. Practices of laboratory for the diagnosis of Legionnaires' disease in France in 2010. Communication orale, 1st ESGLI Meeting, Dresden, Allemagne, 5-7 septembre 2012.

* Surveillance de la Légionellose en France : retour des enquêtes épidémiologiques réalisées entre 2008 et 2014.

Cette étude a été présentée chapitre 3.4.1.6. Elle a fait l'objet de plusieurs communications :

- Présentation en communication orale au congrès européen ESGLI 2015 à Londres (Christine Campese) et au SympoLegio 2015 à Lyon (Laetitia Beraud), et communication affichée à la RICAI en 2015 (Anne Gaëlle Ranc).
- Publication internationale programmée en 2016

* Cas groupés de légionellose associés au voyage en France : 2001 - 2012

L'analyse des données a été menée par l'InVS. Depuis 2001, la France applique les procédures européennes pour les cas de légionelloses associées au voyage (Travel Associated Legionnaires' disease, TALD) notifiés par Eldsnet (European LD Surveillance network, le réseau de surveillance des légionelloses européennes).

Un cas groupé de légionelloses associées au voyage est défini par au moins 2 cas qui ont séjournés dans un hébergement touristique entre 2 et 10 jours avant leurs signes cliniques et pour lesquels les dates de début des signes sont incluses dans la même période de 2 ans.

De 2001 à 2012, 2085 sites français ont été notifiés; 186 (8.9%) des sites étaient associés à des cas groupés de légionelloses associées au voyage. Ces clusters concernaient 472 cas [2-7 cas per site]. La durée médiane de séjour était de 3 jours [1-62 jours]. Les résidents étrangers étaient impliqués dans 56% des clusters. Parmi les 472 cas, des isolats cliniques étaient disponibles pour 50 patients (11%). Des investigations environnementales ont été systématiquement réalisées et des échantillons d'eau prélevés. *Legionella* a été identifié dans 106 sites (59%) et parmi ceux-ci, une concentration en *Legionella* de plus de 10³ ufc/litre a été trouvée dans 64 sites (35%). Parmi les 50 sites pour lesquels une souche clinique était disponible, 40 (80%) étaient associés à un prélèvement environnemental positif. Une comparaison des souches cliniques et environnementales a été possible pour 31 sites, et un profil génomique (SBT et profil PFGE) identique a été trouvé pour 26 sites (84%). Alors que le nombre de sites avec un cluster décroît (23 en 2005 versus 15 en 2012), le pourcentage de sites avec des prélèvements positifs reste important (75% en 2005 versus 50% en 2012 $p=0.25$).

Une nouvelle réglementation a été introduite en Février 2010 qui recommande un prélèvement pour recherche de *Legionella* dans tous les sites d'hébergements touristiques. Actuellement, les sites associés à des clusters de

légionelloses associées au voyage représentent moins de 10% des sites notifiés.

- Campese C, Jarraud S, Forey E, Che D. Clusters of travel associated Legionnaires' disease in France; 2001-2012. Communication orale, 8th International conference on *Legionella*, Melbourne, Australie, 29 octobre-1er novembre 2013.

*** Analyse des facteurs de risque (facteurs d'hôte, exposition) associés aux trois ST prédominants parmi les cas de légionellose en France (ST23, ST1, ST47)**

Notre étude avait pour objectif de décrire les caractéristiques des cas en fonction du Sequence Type (ST) des souches de ces cas. Un modèle de régression de Poisson multivariée modifié a été utilisé pour estimer les taux d'incidence (IRR) et identifier les caractéristiques potentiellement associées aux cas ST23 par rapport aux clones ST1 et ST47. En effet la prédominance des souches ST23 parmi les cas de légionellose avec souche observée en France ne l'est pas pour les autres pays européens. Nous avons étudié 1192 patients infectés par des souches ST1 (n = 109), ST23 (n = 236), ST47 (n = 123) ou d'autres STs (n = 724). La répartition géographique des cas ST23 à travers le pays a été significativement différente par rapport à d'autres groupes ST. Ce génotype était significativement associée à l'absence de corticothérapie par rapport à ST1 (IRR = 0,56; p 0,016). En ce qui concerne l'exposition, le génotype ST23 a été nettement moins associée à des infections nosocomiales par rapport à ST1 (IRR = 0,32; p 0,001), mais il a été plus associée à des infections acquises dans les hôpitaux et chez les patients âgés par rapport à ST47. Enfin, le génotype ST23 a été moins fréquemment associé au voyage que les autres STs. Malgré le grand nombre de cas d'infection par le ST23, nous n'avons pas identifié de caractéristiques spécifiques à cet ST. De façon intéressante et ce qui a été décrit par la suite, nous avons identifié des associations indépendantes entre souches ST1 et transmission nosocomiale et corticothérapie.

- Epidemiologic characteristics associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones of Legionnaires' disease cases in France P. Cassier, C. Campese, Y. Le Strat, D. Che, C. Ginevra, J. Etienne and S. Jarraud. *New Microbes and New Infection*. 2015
- Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie.

*** Etude sur l'impact des retombées de panaches émis par les tours aéro-réfrigérantes des centres nucléaires de production électrique d'EDF sur la survenue de cas de légionellose en France de 2010 à 2012**

L'Agence nationale de sécurité sanitaire (Anses), le CNR des légionelles et l'InVS ont été chargés par la Direction Générale de la santé (DGS) de conduire une étude visant à apprécier le lien entre l'exposition aux retombées des panaches émis par les 28 grandes Tours aéro-réfrigérantes (Tars) des 11 Centres nucléaires de production électrique (CNPE) d'Electricité de France (EDF) contrôlées par l'Agence de Sûreté Nucléaire (ASN) et la survenue de cas de légionellose à proximité de ces installations.

Cette étude a nécessité une collaboration étroite entre l'Anses, le CNR-L, l'InVS et 18 ARS. L'étude a porté sur une période de 3 ans (2010-2012) au cours de laquelle 98 cas ont été inclus dans l'étude. Des souches d'origine clinique ont pu être isolées pour 33 cas (33,7%). En parallèle, les services EDF ont transmis au CNR les souches environnementales isolées des installations CNPE obtenues dans le cadre de leur programme de surveillance obligatoire et selon le protocole de l'étude, afin de les comparer aux souches cliniques disponibles. Le CNR a analysé un total de 1281 souches environnementales, près de 900 souches ont été typées par PFGE, 104 souches par SBT et 682 par anticorps monoclonaux. Comme demandé par le protocole, la majorité (55%) des souches était des *Legionella pneumophila* séro groupe 1. Au total, 96,8% étaient des souches Mab 3/1 négatives (connues pour être moins associées aux cas de légionellose) et 46% appartenaient au ST1. Aucune de ces souches ST1 ne partageait le profil PFGE Paris (Figure 28 et 29).

Les profils génomiques des souches d'origine clinique et environnementale isolées dans le cadre de cette étude n'ont montré aucune similitude. Les résultats de l'étude ne mettent pas en évidence d'association entre l'exposition aux panaches des Tars des CNPE et la survenue des cas de légionellose inclus.

Un rapport a été publié suite à cette étude. Il précise les limites de cette étude, notamment celles liées aux variations des populations de légionelles et à l'échantillonnage des prélèvements environnementaux. Au final, l'ensemble des partenaires impliqués dans la surveillance des légionelloses, notamment à proximité des CNPE, devra rester vigilant et assurer les investigations épidémiologiques, microbiologiques et environnementales nécessaires.

- Campese C*, Descours G, Poirier R, Lhospitalier J, Che D, Jarraud S. Nuclear plants: are they a source of exposure for cases of Legionnaires' disease? 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
- Rapport publié en Juillet 2014 et mis sur le site de l'ANSES en Novembre 2014 : <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/EAUX2014-Ra-CNRLINVSRa.pdf>
- Rapport disponible sur le site de l'InVS
- Publication internationale programmée en 2016

Pour rappel, le CNR avait réalisé une première étude à l'initiative d'EDF en 2006-2008 qui avait consisté à étudier la diversité des profils de 667 souches de légionelles isolées des CNPE et à les comparer aux profils des souches de patients de notre base de données. Cette étude avait permis de mettre en évidence une grande diversité génomique des populations de légionelles présentes au niveau de celles-ci et cette diversité évoluait en fonction du temps ce qui rendait les analyses épidémiologiques rétrospectives difficiles à interpréter. Aucune souche isolée de ces environnements ne présentait de profil identique à ceux des souches d'origine clinique de la collection du CNR.

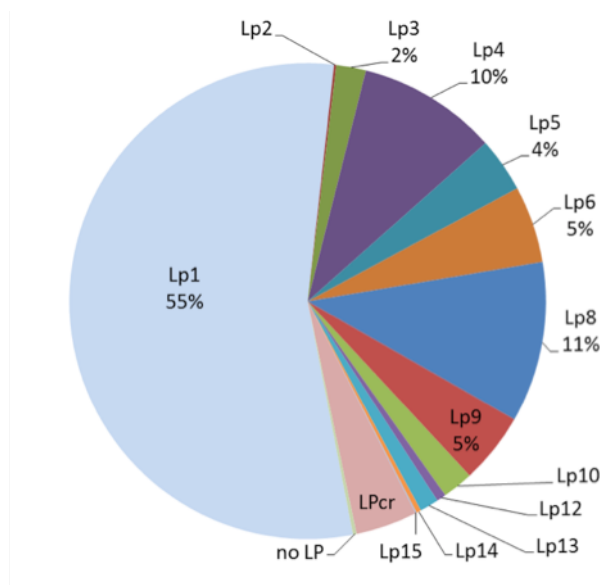
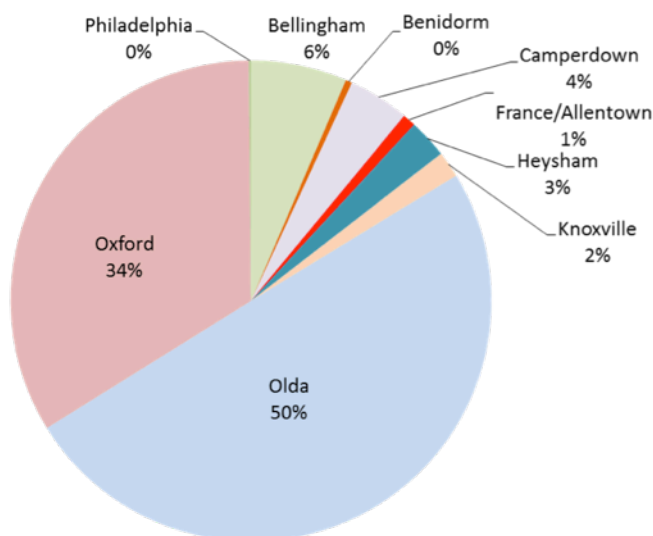


Figure 28. Distribution en terme de sérogroupes des souches environnementales *L. pneumophila* (N=1244)

Distribution des Lp1 en terme de sous-groupes définis par les Mabs (N=682)



Distribution des Lp1 en terme de ST (N=104)

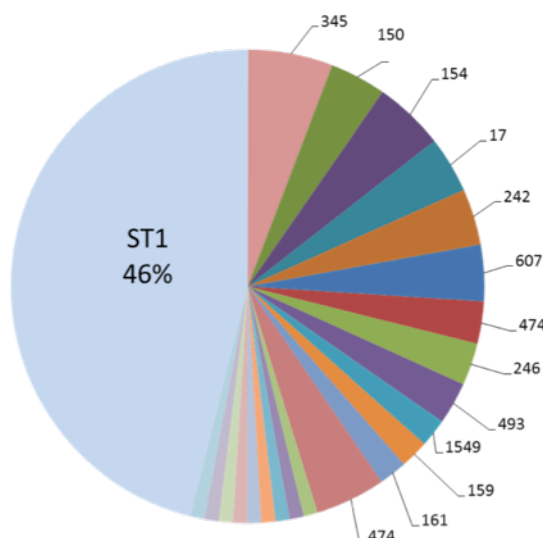


Figure 29. Distribution en terme de sous groupe et de ST des souches Lp1 isolées des Tars des 11 CNPE

3.4.1.8.2- Surveillance des souches responsables des cas de légionellose, en collaboration nationale et internationale

* Les clones majeurs associés aux cas de légionelloses ont émergés récemment et indépendamment (2013 – 2016)

Comme dit précédemment, alors que plus de 2000 Sequence Type (ST) sont répertoriés dans la base de données européenne, près de **50% des souches responsables d'infection humaine** appartiennent à **5 ST (ST1, 23, 37, 47 et 62)**. Les questions clés qui se posaient étaient comment et quand ces STs associés à la survenue de légionellose ont-ils évolué, et comment ont-ils été en mesure de se propager à l'échelle mondiale ?

L'analyse phylogénétique réalisée à partir des données du génome entier de 365 isolats (dont 337 appartenant à ces 5 ST) révèle que ces ST présentent des origines indépendantes au sein d'une espèce très diverse.

Le nombre mutations *de novo* est extrêmement faible avec un maximum de SNPs allant de 19 (ST47) à 127 (ST1), ce qui suggère des émergences dans le dernier siècle. De plus des souches isolées dans des zones géographiques très différentes sont différenciées seulement par quelques SNPs, démontrant une diffusion rapide de ces clones. Ainsi le clone le plus ancien, le clone ST1, est répandu dans le monde, et entre 1940 et 2000 quatre nouveaux clones sont apparus en Europe. Les données de séquençage montrent que pour ces 5 clones des recombinaisons génomiques ont eu lieu récemment conduisant à un pool de variants alléliques partagés qui pourraient contribuer à leur propagation et leur propension accrue pour induire la maladie. La mise en évidence qu'une grande proportion de cas de légionellose soit due à des clones apparus récemment et dispersés à l'échelle internationale, reliés par une évolution convergente, est surprenante pour une bactérie environnementale traditionnellement considérée comme un pathogène opportuniste. Ces données permettent d'émettre l'hypothèse que l'homme a récemment créé de **nouvelles niches environnementales facilitant leur émergence**. L'homme pourrait contribuer à la propagation et la sélection de clones qui sont mieux adaptées à l'infection humaine.

Ces résultats résultent d'un travail auquel nous avons collaboré, réalisé par l'équipe de Carmen Buchrieser (Institut Pasteur Paris), J. Parkhill (Sanger institute, UK), Tim Harrison (PHE, London). L'une des conséquences de ces données est de poursuivre les efforts pour identifier ces niches encore non élucidées notamment pour les souches ST47. Ces travaux seront publiés en 2016 dans Genome Research.

* Développement d'une PCR spécifique du clone ST47 (2012-2016)

Objectifs. Amélioration de la prévention de la légionellose et de la caractérisation de nouveaux réservoirs par **détection rapide par PCR spécifique du clone *L. pneumophila* ST47**. Les souches ST47 sont responsables de près de 10% des

cas de légionellose en Europe du Nord avec souche isolée alors que leur réservoir n'a pas été identifié. En effet ces souches ST47 sont exceptionnellement isolées dans l'environnement. Une analyse de génomique comparative a été appliquée pour développer un test PCR et mieux comprendre l'évolution de cette souche.

Méthodes. L'analyse comparative de 36 génomes représentatifs de l'espèce *L. pneumophila* a été utilisée pour identifier des cibles de PCR spécifiques qui ont ensuite été évalués *in silico* sur 545 génomes séquencés, et *in vitro* sur 436 souches de *Legionella*, 106 échantillons respiratoires et trois échantillons d'eau provenant de sources de ST47 prouvées. Les analyses phylogénétiques ont été réalisées pour comprendre l'évolution des souches ST47.

Résultats. Le gène LPO_1073 a été caractérisé comme étant 100% conservé dans les 129 génomes ST47 analysés. Une PCR en temps réel conçu pour détecter LPO_1073 a été positif pour les 110 souches testées ST47 et conformément aux résultats de culture et de typage précédemment obtenus pour les 106 échantillons respiratoires. Les trois échantillons de l'environnement ont également été positifs. De façon étonnante, 26 des 44 souches ST109 testées parmi les 342 souches non-ST47 étaient positives avec la PCR ST47. L'analyse phylogénétique basée sur les SNPs a été entreprise pour comprendre ce résultat: les génomes des ST109 PCR-positives étaient presque identiques aux génomes des ST47, à l'exception d'une région recombinée probablement acquise par les ST47 d'une souche ST62 (ou ST62-like). Ces souches ST109 à la différence des souches ST47 sont rarement impliquées dans les cas de légionelloses.

Conclusion. L'analyse génomique a permis la conception d'un test de PCR hautement spécifique pour la détection rapide des souches ST47. En outre, cette analyse a permis de décrire l'évolution des souches ST47 à partir des souches ST109 par recombinaison homologue avec ST62. Nous émettons l'hypothèse que cette recombinaison a généré une propension accrue pour induire la maladie.

Les données de la littérature ont montré pour quelques investigations la présence de souches ST47 dans les spa. Cette PCR va permettre d'investiguer ce type d'installation.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le PHE de Londres (Tim Harrison), Sanger Institute et l'institut Pasteur de Paris. Ces travaux seront publiés en 2016.

* **Stabilité spatio-temporelle des souches *L. pneumophila* dans l'environnement (2011-2013)**

Pour étudier la dynamique spatio-temporelle des souches de *L. pneumophila*, 1258 souches environnementales recueillies entre 2000 et 2012 dans la région de Rennes, et 5 isolats cliniques prélevés lors d'épidémie en 2000 et 2006 à Rennes ont été génotypés par MLVA (Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Analyse). Les résultats montrent la stabilité des souches de *L. pneumophila*, à la fois dans l'espace et dans le temps. En effet, dans le réseau d'eau chaude de la région de Rennes, il existe une souche prédominante (appartenant au ST 59) présente à tous les points étudiés et cela depuis 2000, ce qui représente 77% des isolats totaux. Les souches de ce clone n'ont jamais été impliquées dans des épidémies en France. En revanche, dans les tours aéro-réfrigérantes analysées, une autre souche est prédominante, appartenant au ST1 ; cette souche n'a pas été la cause des épidémies à Rennes. Les premiers résultats montrent également que ces souches sont plus résistantes au chlore que les souches de référence. En outre, une analyse statistique temporelle et spatiale révèle le comportement dynamique de la bactérie dans les réseaux d'eau de la ville de Rennes, en association avec environ 20 paramètres physico-chimiques de l'eau.

Ces résultats montrent qu'une souche prédominante de *L. pneumophila* est capable de coloniser l'ensemble du réseau d'eau d'une ville.

- Pierre LE CANN, Guillaume ROBALDO, Jean François GUEGAN, Sophie JARRAUD, Christine POURCEL, Présentation orale congrès international, Melbourne 2013.

* **Première caractérisation des *Legionella pneumophila* dans les pays tropicaux : isolats environnementaux du Cameroun, du Cambodge et du Sénégal (2009-2016)**

Objectif : de mai 2009 à Juin 2010, 635 échantillons d'eau de réseau d'eau chaude et de tours aéro-réfrigérantes des hôtels et des hôpitaux au Cameroun (212), Cambodge (216) et Sénégal (207) ont été réalisées dans le cadre d'un projet multicentrique dans le but d'une meilleure connaissance sur la présence, la distribution et les caractéristiques moléculaires des souches de *Legionella* isolées dans les régions tropicales. Parmi ceux-ci, 43% des échantillons des hôtels et 23% des hôpitaux étaient positifs pour *Legionella* par culture. Au total 234 souches ont été isolées. De part le développement du NGS nous avons entrepris en 2015-2016 de décrire les caractéristiques moléculaires de ces souches *L. pneumophila* d'origine environnementale des pays tropicaux.

Méthode: Parmi les 234 souches *Legionella* isolées, 173 étaient des *L. pneumophila* (Sénégal, n = 17, Cameroun; n = 49 et Cambodge, n = 107). Leurs génomes ont été séquencés en utilisant la technologie Nextera XT (Illumina®) et des longueurs de reads de 150pb paire-ends. Les séquences ont été assemblées à l'aide de l'assembleur SPAdes, puis les séquences des 7 gènes utilisés pour définir le type de séquence (ST) ont été extraites des assemblages exceptés pour

le gène *mompS* qui peut exister en multi-copies. Ainsi, les gènes *mompS* ont été amplifiés par PCR et re-séquencés en utilisant la technologie Sanger. Pour analyser les relations phylogénétiques les assemblages des génomes entiers ont été comparés en utilisant le logiciel parsnp.

Résultats : Les 173 souches (88 Lp1 et 85 Lp sg2-14) appartenait à 33 STs différents, y compris 20 STs nouvellement décrits dans cette étude. Les souches ST1 et proches ST1 isolées représentaient entre 38 et 59% de toutes les souches *L. pneumophila* testées. Le ST1 était le seul ST identifié dans les 3 pays. Ces souches ST1 et proches ST1 appartenait aux sg1, sg4 et sg7 de *L. pneumophila* et représentaient respectivement 11, 33 et 52% des souches isolées à partir des réseaux d'eau de l'hôpital au Cambodge, au Sénégal et au Cameroun. En outre, des souches ST59 ont été isolées au Cambodge, ST68 et ST80 au Cameroun. Les souches ST1 et proches ST1 des trois pays diffèrent du génome de référence Paris par 21 à 8098 SNPs. Les souches les moins divergentes étaient celles isolées au Cameroun, les plus divergentes au Cambodge.

Conclusion : *L. pneumophila* est présent dans le réseau d'eau des systèmes hospitaliers et des hôtels dans les pays tropicaux. De manière similaire à l'hémisphère Nord une proportion importante de *L. pneumophila* dans les pays tropicaux appartient au ST1 et STs proches.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Benoit Garin et Carmen Buchrieser de l'Institut Pasteur Paris.

3.4.1.8.3- surveillance de la résistance de *Legionella* aux antibiotiques

Suite à une collaboration depuis plusieurs années avec le laboratoire de Bactériologie de Grenoble (Pr Max Maurin) sur la résistance des légionelles aux quinolones, nous avons participé à la description faite par Max Maurin de deux cas d'acquisition de résistance *in vivo* au cours du traitement par séquençage haut-débit réalisé sur prélèvements respiratoires (Shadoud et al.)

Dans une première étude, l'équipe de Max Maurin a décrit par sélection *in vitro* les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones impliquant systématiquement comme première étape la mutation *gyrA83* (Almahmoud et al.) permettant ainsi de mettre au point une PCR en temps réel ciblant la région QRDR de *gyrA* (Shadoud et al.). Sur une cohorte de 82 cas de légionellose incluant 139 prélèvements respiratoires, la résistance aux quinolones a été suspectée par cette PCR et l'étude de la courbe de fusion pour 7 prélèvements de 4 patients. La mutation T83I a été confirmée pour 2 de ces patients par technologie Sanger puis par séquençage haut débit (*Next Generation Sequencing* (NGS)) réalisé sur ces amplicons révélant une sélection progressive des sous populations résistantes au cours du temps. Ainsi, pour le 1er patient la mutation représentait 0,029 % de la population au 1er jour du diagnostic, et 94% de la population après 4 jours de traitement par lévofloxacine. Pour le second patient, un premier prélèvement réalisé après 3 jours de trithérapie ciprofloxacine + ceftazidime + teicoplanine montrait une sous population résistante de 0,01% qui atteignait 75% puis 85% après respectivement 2 et 5 jours de bithérapie par érythromycine et ciprofloxacine.

- Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebel C, Timsit JF, Schneider D, Maurin M. Hidden Selection of Bacterial Resistance to Fluoroquinolones In Vivo: The Case of Legionella pneumophila and Humans. *EBioMedicine*. 2015 Jul 17;2(9):1179-85.

Les autres études concourant à la surveillance de la résistance aux macrolides ont été développées chapitres 3.2.2. et 3.6.

3.4.2- Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

* Le CNR collabore au **réseau européen de surveillance des légionelloses ELDSNet** (European Legionnaires'Disease Surveillance Network) ; le réseau initial Ewglinet (European working group for Legionella infections Network) a été transféré depuis le 1^{er} avril 2010 à l'ECDC (European Centre for Disease prevention and Control). Nous sommes impliqués au sein de ELDSNet ayant été nommé « *contact point – laboratory expert* » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen (S. Jarraud). Nous recevons ainsi que l'InVS, la notification de tous les cas de légionelloses liés aux voyages déclarés par le système européen de surveillance.

Ceci implique la participation au meeting annuel qui regroupe 1 correspondant microbiologique et 1 correspondant épidémiologique de chaque pays membre, le 5^{ème} aura lieu en septembre 2016 à Amsterdam.

* Concernant les aspects plus microbiologiques, S. Jarraud a été élu à l'**executive committee de ESGLI (ESCMID Study Group of Legionella Infection)** (trésorière). Le nouveau comité exécutif élu en septembre 2015 comprend Valeria Gaia (Président, Suisse), Soren Uldum (Secrétaire, Danemark), Jeroen den Boer, (membre, épidémiologie, Hollande), Maria Luisa Ricci (membre, environnement et relation avec ELDSNet, Italie), Jacob Moran-Gilad (membre, microbiologie & NGS, Israël).

* Dans le cadre du développement et de la standardisation du NGS à des fins épidémiologiques, Jacob Moran-Gilad a mis en place en septembre 2015 **deux groupes de travail sur le *Next-generation sequencing (NGS)*** auxquels le CNR (Christophe Ginevra, Sophie Jarraud) participe. Ces groupes de travail sont internationaux et comprennent la participation de **10 membres** : Kathy Bernard, Winnipeg, Canada ; Alex Ensminger, Toronto, Canada ; Norman Fry, London, UK ; Sophie Jarraud, Lyon, France ; Natalia Kozak-Muiznieks & Brian Raphael, Atlanta, USA ; Christian Lück, Dresden, Germany ; Jacob Moran-Gilad, Jerusalem, Israel ; Rodney Ratcliff, Adelaide, Australia ; Søren Uldum, Copenhagen, Denmark et de **conseillers experts** : Anthony Underwood, London, UK - bioinformatics expert ; Sophia David, Cambridge, UK – bioinformatics expert

Le premier groupe « scheme development » a pour but de définir les gènes utilisés et la standardisation du cgMLST. Le second groupe « genomic data » pour objectif de mettre en place une base de données de génomes afin d'évaluer les méthodes d'interprétation du WGS, de discuter du choix des logiciels, interface informatique, stockage et conservation des données.

Plusieurs réunions téléphoniques ou physiques ont eu lieu auxquelles nous avons participé :

- Réunion téléphonique le 27 octobre 2015
- Réunion téléphonique du sous-groupe 1 le 2 mars 2016
- Réunion à Londres le 30 mars 2016
- Réunion téléphonique du sous-groupe 2 le 3 août 2016
- Réunion téléphonique du sous-groupe 1 le 18 août 2016

Les missions du groupe de travail sont résumées ci-dessous :

Remit for the ESGLI NGS WG

1. Identify and prioritise relevant public health and clinical applications of Whole Genome Sequencing (WGS) in the field of legionellosis (e.g. outbreak investigation, national and international surveillance etc.).
2. Decide which species other than *L. pneumophila* (if any) should be covered?
3. Review and compare existing genomic approaches for phylogenetic analysis, characterisation and typing of Legionella (e.g. core genome MLST, whole genome MLST, SNP mapping, other techniques or modifications of those approaches).
4. Suggest ways to create and sustain an agreed global nomenclature for Legionella strain typing and continuously validate, update and refine a WGS-based typing scheme.
5. Evaluate and harness genomic approaches to introduce fit-for-purpose, robust, reproducible and practicable analytical tools that would meet public health, clinical and medicolegal requirements.
6. Discuss the architecture, use, management and curation of a shared public WGS database and its associated metadata.
7. Create a shared Legionella genome repository accessible to WG members for scheme development purposes.
8. Explore modalities for quality control and quality assurance of legionella sequence data determination, deposition and sharing / comparison.
9. Discuss possible efforts for proficiency testing / EQA to scheme users.
10. Ensure reverse compatibility with current SBT scheme is maintained.
11. Recommend bioinformatics tools and interfaces in support of the above tasks and objectives.
12. Develop joint research initiatives

Group members:

Kathy Bernard, Winnipeg, Canada
Alex Ensminger, Toronto, Canada
Norman Fry, London, UK
Sophie Jarraud, Lyon, France
Natalia Kozak-Muiznieks & Brian Raphael, Atlanta, USA
Christian Lück, Dresden, Germany
Jacob Moran-Gilad, Jerusalem, Israel
Rodney Ratcliff, Adelaide, Australia
Søren Uldum, Copenhagen, Denmark

Expert advisors:

Anthony Underwood, London, UK - bioinformatics expert
Sophia David, Cambridge, UK – bioinformatics expert

* Sur le plan de la surveillance de la **sensibilité aux antibiotiques**, participation à la mise en place au sein de l'EUCAST de méthode de détection de la résistance de *L. pneumophila* (G. Lina)

* Les données de typage par SBT de toutes les souches d'origine clinique et des souches environnementales en lien avec une investigation, sont systématiquement envoyées afin de renseigner la **base de données du réseau EWGLI** (www.ewqli.org) avec comme renseignements : le numéro CNR de la souche, la date d'isolement, la ville d'isolement, le département d'isolement, les données du SBT et des notions épidémiologiques quand elles sont connues comme : la notion de cas groupés, de cas nosocomiaux, de cas liés au voyage.

En septembre 2015, les données de 10 970 souches européennes étaient renseignées dans la base de données

EWGLI ; les données Françaises représentent 27% (3027 isolats) des données de l'ensemble des pays européens.

* Nous avons participé aux comités scientifiques ou modération de différents congrès qui ont notamment pour thème la surveillance des légionelloses :

- membre de l'«International Scientific Programme Committee », 8th international Conference on *Legionella*, 29 Oct – 1 Nov 2013, Melbourne, Australie (S. Jarraud)
- membre du comité scientifique du 5^{ème} congrès ESGLI à Amsterdam en Septembre 2016 (S. Jarraud)
- modératrice : Congrès International de la Bio-Surveillance de l'environnement, Casablanca, Maroc, 24-26 Octobre 2013 (S. Jarraud)

* Expertises de projet pour :

- o Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada
- o Actions concertées Inter-Pasteuriennes (ACIP), Paris
- o Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST), Québec
- o le groupe ESGLI

* Voici quelques exemples d'investigations européennes auxquelles le CNR a participé ces dernières années :

- Investigation de 2 cas de légionellose en relation avec les cas groupés de l'Hôtel Diamante Beach à Calpe en Espagne (2012).

Deux cas de légionellose (chez un couple) ayant séjourné à l'Hôtel Diamante Beach à Calpe en Espagne nous ont été signalés par le CH de Salon de Provence où ils étaient hospitalisés avec envoi d'expectorations pour recherche de légionelles. La culture conventionnelle et la co-culture sur tapis amibien n'ont pas permis d'isoler de souches. Les 2 prélèvements pulmonaires ont été analysés par Nested SBT. L'amplification n'a pas été possible pour aucun des gènes pour l'un des patients. Pour le deuxième patient, nous avons obtenu un ST 23 identique au ST des souches isolées des patients Anglais et Espagnols associés à l'épisode de cas groupés.

- Investigation de 3 cas Français en relation avec un cas groupés de 5 patients associés à un hôtel à Rome (2012).

Après la notification du 1er cas Français en octobre 2011, une investigation environnementale a été réalisée et plusieurs prélèvements étaient positifs à *Legionella pneumophila* séro groupe 1 de 4200 à 6000 UFC/L. L'hôtel a été fermé et désinfecté et plusieurs prélèvements sur plusieurs sites réalisés après désinfection étaient négatifs en février 2012 pour *L. pneumophila*. Après la réouverture en avril 2012, 4 nouveaux cas ont été déclarés au niveau européen dont 2 cas français entraînant de nouveaux prélèvements réalisés en avril. Une souche était disponible au CNR (souche ST20, pulsotype G, sous groupe knoxville). Collaboration avec Maria Cristina Rota et Maria Luisa Ricci (Italie).

- Cas groupés de légionellose à Renfrew, une petite ville à l'ouest de Glasgow, Ecosse (2013).

Dix cas confirmés et un cas probable ont été déclarés avec des dates de début des signes entre le 6 juin et le 29 juillet 2013. Tous les cas ont été diagnostiqués par antigènes urinaires et une souche Lp1 était disponible par le laboratoire écossais. La patiente Française, écossaise résidente en France s'est rendu à Renfrew, dans un hotel pendant 5 jours, puis a séjourné en Angleterre et est retournée en France le 29 juillet. Ces dates de début des signes débutent le 28 juillet. La souche isolée de son prélèvement présentait les mêmes caractéristiques que la souche isolée en Ecosse (ST37, sous groupe Philadelphia, profil PFGE connu au CNR). La souche a été envoyée au Dr Diane Lindsay du CNR des légionelles en Ecosse.

- Cas groupés de légionellose pour un patient Danois et un patient Français ayant séjourné dans le même hébergement de tourisme (appartement) à Rome (2013).

Les souches des 2 patients et la souche environnementale isolée de cet appartement à Rome présentait les mêmes caractéristiques : ST758 et sous groupe Knoxville. Aucune autre souche de la base de données européenne ne présentait ces mêmes caractéristiques au moment de l'investigation. Collaboration avec Soren Uldum (Danemark) et Maria Luisa Ricci (Italie).

3.5- CONTRIBUTION A L'ALERTE

3.5.1- Procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal

Comme décrit précédemment des liens étroits se sont tissés depuis de nombreuses années entre les membres du CNR et l'InVS. L'alerte de l'InVS est réalisée par téléphone et associée à un courrier électronique adressé à Agnès Lepoutre et Christine Campese. Dans certaines circonstances, la DGS peut être alertée par courrier électronique à DGS-alerte (alerte@sante.gouv.fr).

La détection de tout phénomène anormal que ce soit dans le domaine clinique (forme atypique, forme persistante, cas chez les nouveaux né...), diagnostic (problème de kits), épidémiologique (cas groupés) ou microbiologique (apparition de clones émergents) a conduit à une information de nos correspondants à l'InVS.

Lors de l'investigation de cas groupés, une cellule peut être mise en place constituée selon les besoins avec un représentant du CNR et l'ARS, l'InVS, CIRE, Cliniciens, EOH, CCLIN, DGS.

3.5.2- Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Les investigations des cas groupés sont décrites chapitre 3.4.1.7.

En dehors de notre contribution à l'investigation de ces cas groupés, plusieurs investigations ont été à l'origine de nombreux contacts avec l'InVS.

* Investigation d'une augmentation du nombre de cas associés à la même souche à Aurillac depuis 2008.

En 2012, une alerte a été réalisée par le CNR du fait de l'isolement de 3 souches ayant les mêmes caractéristiques : profil PFGE : Pulsotype F ; Sequence Type : 259 ; sous-groupe Philadelphia dans la ville d'Aurillac. En analysant la base de données du CNR, sur les 37 souches Pulsotype F de notre banque de données nous avons 6 souches isolées à Aurillac entre 2008 et 2012. L'InVS et l'ARS concernée ont lancé une enquête épidémiologique à la recherche d'une source commune de contamination.

Les données de l'enquête en 2014 sont les suivantes : sur la période 2008-2014, 13 cas de légionellose ont été dénombrés. Une souche clinique a été isolée pour 8 d'entre eux : il s'agissait d'une souche de *L. pneumophila* sérotype 1, pulsotype F, ST 259 et sous-groupe Philadelphia dans 7 cas sur 8.

Ces patients présentaient comme point commun :

- soit de résider à Aurillac ;
- soit de résider dans un périmètre de 10-15 km et d'être venu au moins une fois à Aurillac dans la période d'incubation.

Ces données font suspecter une origine de contamination commune. Les données recueillies pour les souches ST 259 (83 souches, principalement cliniques) dans la base de données européenne (EWGLI) montrent une prédominance en France et suggèrent une potentielle source de contamination particulière.

Des interrogatoires des cas ou de leur entourage concernant toutes les expositions possibles (grandes surfaces fréquentées, station de lavage de voiture...) ont été réalisés systématiquement pour chaque cas par l'ARS-DT15 et n'ont pas permis d'identifier d'origine commune.

Les investigations se sont ensuite portées sur de potentielles sources d'exposition commune :

- il existe dans l'agglomération d'Aurillac 3 sites industriels avec 5 à 6 tours aéro-réfrigérantes (TAR) connues. L'autosurveillance de ces TAR dans le périmètre d'investigation est réalisée par les industriels. En 2013, des contrôles inopinés avaient été effectués en présence de l'inspecteur des ICPE et de l'ARS et n'avaient pas mis en évidence de dépassement de seuil réglementaire. Fin 2014, une souche environnementale (isolée en quantité inférieure au seuil) a néanmoins été adressée au CNR pour comparaison : elle présentait des caractéristiques différentes des souches cliniques ;
- Une usine de plasturgie possédant une installation avec 8 laveurs d'airs (fonctionnant sur le même principe qu'une TAR) a été identifiée et également investiguée par l'ICPE et l'ARS en 2013 sans succès. Bien qu'il

n'existe pas de réglementation spécifique pour ce type d'installation, dans ce contexte, des contrôles seraient mis en place au moins 2 fois par an.

- Des prélèvements de compost industriel se sont révélés négatifs

Une vigilance particulière a été apportée par les différents acteurs (CNR, InVS et ARS-DT15) aux nouveaux cas déclarés en 2015.

Parallèlement, la surveillance des souches de légionelles réalisée par le CNR a permis de mettre en évidence l'augmentation au niveau nationale de ces souches ST259 et ST proches tels que le ST701 (voir chapitre 3.4.1.5).

*** Episode de cas groupés dans un établissement de santé sur plusieurs années confirmé par la méthode de spoligotypage**

Quatre cas de légionellose ont été diagnostiqués chez des patients ayant fréquenté le même service hospitalier sur une longue période : 1 cas en 2009, 1 cas en 2011 et 2 cas en 2014. Une souche était disponible pour les cas diagnostiqués en 2011 et 2014. Les souches présentaient les mêmes caractéristiques : ST 1, profil PFGE Paris, sous-groupe Philadelphia. Des souches environnementales isolées en 2009 et 2014 présentaient les mêmes caractéristiques. Cette souche étant endémique en France, la source de contamination ne pouvait être formellement identifiée, certains cas étant des cas nosocomiaux probables. La méthode de spoligotypage a permis de confirmer la source de contamination : les 3 souches d'origines cliniques (2011 et 2014) et les 2 souches environnementales (2009 et 2014) présentent le même spoligotype : SPL34. Parmi les 400 isolats ST 1 isolés dans toute la France et analysés en spoligotypage, seul un isolat issu d'une autre investigation présentait ce même spoligotype.

*** Investigation de cas groupés de pneumopathies sévères survenues au Foyer de l'Orée du jour à Aix-en-Provence du 6 au 30 janvier 2015.**

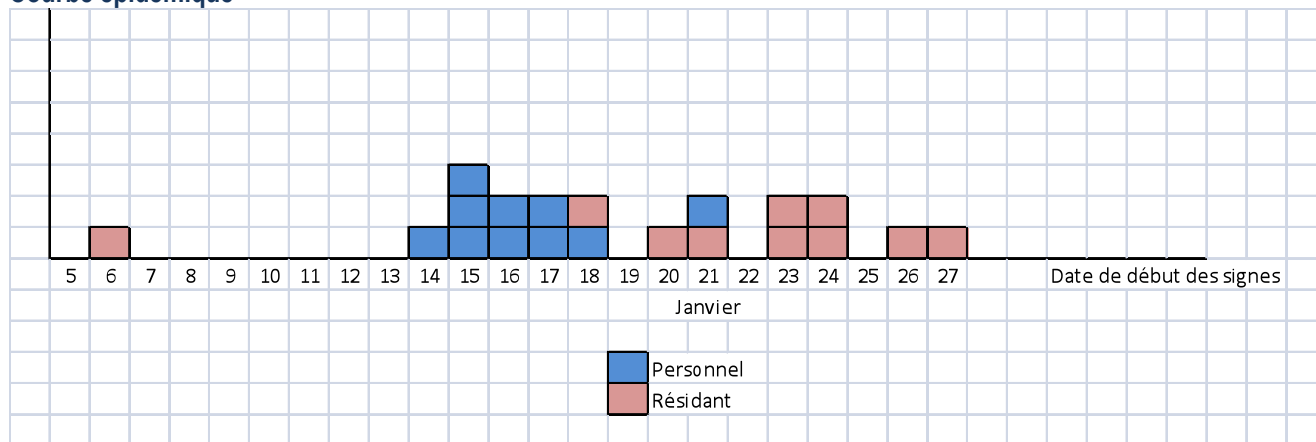
Suite à 22 cas de pneumonies fébriles à début brutal touchant des résidents (10) et des personnels (12) dans le foyer l'Orée du jour entre le 6 et le 30 janvier, des investigations épidémiologiques et biologiques ont été mises en œuvre par Cire Sud. Au total 12 patients ont été hospitalisés au CH-d'Aix dont deux en réanimation (état très grave nécessitant pour l'un une oxygénation extra corporelle et pour l'autre une ventilation positive), deux autres ont été hospitalisés en clinique ou en hospitalisation à domicile.

La durée d'incubation a été estimée à une dizaine de jour. Le tableau initial était d'allure pseudo-grippale avec fièvre élevée (40°C), frissons, sueurs, myalgies et courbatures sans rhume ni maux de gorge, suivi 48h après d'une toux discrète, d'une dyspnée importante, de douleurs thoraciques et d'asthénie. A l'imagerie pulmonaire des anomalies radiologiques avec foyers pulmonaires et atteintes pleurales étaient visibles. Les patients étaient plutôt jeunes avec une moyenne d'âge de 46 ans (43 pour les résidents et 49 pour le personnel). La répartition par sexe était de 11 hommes et 11 femmes. L'évolution clinique a été finalement favorable pour l'ensemble des cas.

Aucun agent infectieux n'a pu être identifié. Aucun résultat virologique ne s'est avéré positif pour les 6 patients testés malgré un panel de test large comprenant : la Grippe A et B testée par le CNR influenza, e VRS, les Rhinovirus, les Adénovirus, le Bocavirus, le Coronavirus, les virus parainfluenzae et les enterovirus. De même, les tests recherchant *Coxiella*, les mycoplasmes et *Chlamydia* pulmonaires, réalisé par le laboratoire du CH d'Aix-en-Provence se sont révélés négatifs.

Les données épidémiologiques n'étaient pas en faveur d'une légionellose, d'autant que le personnel du foyer n'était pas exposé à l'eau des douches. Depuis la mise en œuvre des mesures préventives au Foyer l'Orée du jour (Masques, gants et LM avec SHA) aucun nouveau cas n'a été détecté. Les recherches de *Legionella* effectuées dans l'eau du réseau du foyer étaient négatives.

Courbe épidémiologique



Les résultats obtenus pour les légionelles ont été d'interprétation difficile. Une PCR Lp1 était positive chez la patiente de réanimation la plus grave, ses antigènes solubles urinaires (Lp1) étaient négatifs. Les PCR *Legionella spp.* et *Legionella pneumophila* étaient négatives pour une autre patiente ainsi que les antigènes urinaires mais la PCR nichée (Nested-SBT) plus sensible était positive pour 1 gène sur 7 (neuA = 9). Enfin pour une 3^{ème} patiente, la PCR *Legionella* était négative ainsi que les antigènes solubles urinaires. Pour les 7 autres patients testés, les antigènes urinaires légionelles réalisés par le laboratoire du CH d'Aix-en-Provence étaient tous négatifs.

* **Episodes successifs de légionellose chez plusieurs patients** (voir chapitre 3.4.1.3)

3.6- TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

* **Caractérisation des mécanismes de résistance aux macrolides associés à des protéines d'efflux**

- Caractérisation de protéines d'efflux Lpp2879-Lpp2880 et évaluation de leur rôle dans la résistance aux macrolides

Dans deux des douze lignées de *L. pneumophila* résistantes aux macrolides que nous avons sélectionnées *in vitro*, nous avons identifié deux gènes, *lpp2879-lpp2880* (opéron), pour lesquels une mutation était observée en amont, dans une région correspondant au promoteur et au site de fixation du ribosome, respectivement. Une étude bio-informatique a montré que les protéines Lpp2879 / Lpp2880 de la souche Paris présentaient des homologies de séquence avec les protéines AcrA / AcrB d'*E. coli*, qui s'associent à la protéine TolC pour former une pompe à efflux (Gilbert *et al.*, données non publiées).

Nous avons fait l'hypothèse que ces mutations pourraient majorer l'expression des protéines Lpp2879 / Lpp2880 et induire une résistance par efflux via une pompe TolC-dépendante.

L'efflux pourrait ainsi constituer un mécanisme de résistance additionnel aux mécanismes ribosomiques précédemment identifiés.

En 2014 – 2015, nous avons :

- déterminé le rôle de Lpp2879 / Lpp2880 dans une sensibilité diminuée aux macrolides chez *L. pneumophila*, par délétion / complémentation ;
- démontré l'impact des mutations observées sur l'expression de cette pompe à efflux par fusion traductionnelle avec la protéine GFP ;
- identifié un mécanisme d'induction de l'efflux en présence de concentrations sub-inhibitrices de macrolides, également chez une souche sauvage, ce mécanisme étant initialement non suspecté.

Ces travaux ont été réalisés par une étudiante en Master 2 Recherche « Infectiologie Fondamentale » (UCBL, Lyon), Mme Clémence Massip. Ils font actuellement l'objet d'une publication soumise à *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* en 2016 :

- *Role of lpp2879-2880, two genes of putative efflux pump, in macrolide resistance of Legionella pneumophila.* Massip C, Descours G, Ginevra C, Doublet P, Jarraud S, Gilbert C.

Nous avons ensuite corrélé ces résultats avec les résultats de distribution des CMI dans la population sauvage de 109 souches testées (cf paragraphe précédent). Nous avons observé une corrélation entre des CMI plus élevées pour l'azithromycine pour une partie de ces souches et la présence des protéines d'efflux Lpp2879 / Lpp2880. Ces protéines semblent être plus particulièrement présentes chez les souches ST1, ST701 et ST proches.

L'analyse de 432 souches cliniques et environnementales additionnelles a confirmé une distribution clonale des protéines Lpp2879 / Lpp2880 parmi ces ST, et parmi les souches de *L. pneumophila* subsp. *pascullei*.

Ces travaux font l'objet d'un article soumis à *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* en 2016 :

- Wild type MIC distribution of *Legionella pneumophila* isolates revealed a decreased susceptibility to macrolide correlated with the clonal distribution of efflux pump genes. [Vandewalle M](#), [Massip C](#), [Descours G](#), [Charavit J](#), [Chastang J](#), [Billy PA](#), [Boisset S](#), [Lina G](#), [Maurin M](#), [Jarraud S](#), [Ginevra C](#).

* Analyse RNAseq à grande échelle de souches *Legionella pneumophila* en croissance intra-macrophagique - projet financé par la FRM

1- Recherche de déterminants bactériens associés aux cas sévères de légionellose

En France, 98% des cas confirmés de légionellose sont hospitalisés et 40% nécessitent une admission en réanimation. Le taux de mortalité global est d'environ 10% et peut atteindre plus de 30 à 50% pour les patients en unités de soins intensifs. L'évolution péjorative de la légionellose peut être liée à des facteurs d'hôtes et de prise en charge de l'infection. Notre hypothèse de travail est que cette évolution pourrait également en partie être corrélée à des facteurs bactériens particuliers, ou à l'expression de profils de gènes. Les objectifs globaux de ce projet sont (1) de caractériser les différences génétiques parmi les souches Lp1 en relation avec la sévérité des légionelloses associées; (2) de réaliser une étude d'expression de gènes différentielle (DGE) par RNA-Seq qui nous permettra d'identifier des déterminants de pathogénicité au niveau transcriptomique.

Pour répondre à cette question, nous avons sélectionné 32 isolats d'une cohorte de 540 patients issue d'une étude multicentrique Française (C. Chidiac *et al.*, 2012) pour lesquels des données de nature démographiques, cliniques, radiologiques, biologiques et thérapeutiques sont documentées. Ces 32 isolats sont répartis en 2 groupes : le 1er groupe comprend 16 souches isolées de patients décédés dans les 7 jours suivant leur diagnostic et le second groupe comprend 16 souches isolées de patients sortis à domicile dans les 7 jours suivant le diagnostic. Les deux groupes ne se différenciaient pas en regard des facteurs de risque, du délai diagnostic et des données thérapeutiques rapportées. Par ailleurs la caractérisation des souches par PFGE et par Sequence-Based Typing n'identifiait pas de clones spécifiques pour l'un de ces deux groupes.

Les génomes des 32 souches ont été séquencés par la société GATC avec un séquenceur à haut débit MiSeq (technologie Illumina, Paired-end 300bp). Ce projet a été l'occasion de comparer plusieurs logiciels d'assemblage *de novo* de génomes bactériens : des assembleurs de type « Overlap - Layout - Consensus » ou OLC (Newbler, Edena), des assembleurs basés sur des graphes de De Bruijn (SPAdes, SOAPdenovo2, Ray, Velvet) et un assembleur combinant ces deux approches (MaSuRCA). La première remarque est que chaque outil propose des options et le choix de ces paramètres peut influencer significativement la qualité des résultats. La seconde remarque est que le « meilleur » logiciel pour une souche ne l'est pas toujours pour une autre. Des assemblages par alignement sur un génome de référence proche ont également été obtenus pour quelques souches, le nombre de contigs et de scaffolds obtenus est du même ordre de grandeur que pour les assemblages *de novo* et les solutions de continuité se situent fréquemment aux mêmes endroits (typiquement autour des transposases). Différentes métriques permettant d'évaluer la qualité des assemblages obtenus par les différentes méthodes sont calculées avec l'outil QUASt (Quality ASsessment Tool). Les points critiques dans les assemblages sont par ailleurs repérés en utilisant des outils qui vérifient la cohérence entre les assemblages obtenus et le matériel qui a permis de les obtenir (lectures) comme l'outil REAPR.

Enfin, en combinant différents critères pour la comparaison des méthodes d'assemblage tels que la taille totale du génome obtenu, le nombre de scaffolds, la valeur N50, le pourcentage de bases non erronées et le nombre de gènes connus retrouvés, nous concluons que les assembleurs donnant les moins bons résultats avec nos données sont Edena, MaSuRCA, Ray et SOAPdenovo2. Parmi les 3 assembleurs donnant les meilleurs résultats (Newbler, SPAdes et Velvet), nous avons choisi de retenir SPAdes pour la suite des analyses. A noter cependant que SPAdes est connu pour générer des petits scaffolds non pertinents qui doivent être filtrés, ce que nous avons fait.

Ces génomes ont été soumis à la plate-forme MicroScope développée par le Genoscope. MicroScope est une plate-forme combinant de nombreux outils bio-informatiques spécialisée dans l'annotation et l'analyse des génomes microbiens.

L'analyse comparative des génomes est en cours ainsi que la partie consacrée à l'analyse RNA-Seq des souches en intra-macrophagique.

2- Les souches émergentes ST701 appartiennent à une sous-espèce différente de la sous-espèce *L. pneumophila* sp. *pneumophila*

En marge de la question principale, des résultats préliminaires de reconstruction d'un arbre phylogénétique des génomes de ces souches avec les outils parsnp et Gingr semblaient montrer qu'une des souches séquencées dans le cadre de ce projet (souche ST701) formait un groupe monophylétique avec les sous-espèces *L. pneumophila* sp. *fraseri* et *L. pneumophila* sp. *pascaliei*. L'espèce *Legionella pneumophila* est subdivisée en trois sous-espèces : *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*, *L. pneumophila* subsp. *fraseri* et *L. pneumophila* subsp. *pascaliei*. Selon les outils disponibles jusqu'alors, les cas de légionellose impliquent habituellement la sous-espèce *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*.

Des études de phylogénie plus poussées ont donc été réalisées pour confirmer ces données en utilisant les séquences des 45 protéines ribosomiques en unicopie de 80 génomes de *Legionella*, *Tatlockia*, *Fluoribacter* et *Coxiella* extraites de la banque RiboDB et alignées avec le programme MAFFT et en séquençant une quinzaine de souches ST701 de la collection du CNR. L'arbre phylogénétique reconstruit avec un modèle d'évolution choisi montre que les souches de *L. pneumophila* subsp. *fraseri* et *L. pneumophila* subsp. *pascaliei* forment un clade fortement soutenu dans lequel se positionnent également les souches ST701. Ces observations suggèrent pour la première fois qu'un clone émergent, les souches ST701, pourrait appartenir aux sous-espèces *L. pneumophila* subsp. non-*pneumophila*.

Partenaires :

Ce travail est fait en collaboration avec G. Perrière, UMR CNRS 5558-LBBE, équipe « Biométrie et Biologie Evolutive », Lyon 1 (projet financé par la FRM) qui apporte les compétences en analyses bio-informatiques. L'ensemble de ces analyses a été réalisé par une bio-informaticienne recrutée pour ce projet (A. Fournier) en concertation avec l'ingénieur du CNR, Christophe Ginevra. Ce projet avait pour objectif outre la question posée le transfert de compétences du laboratoire de bio-informatiques au CNR.

Legionella et peptides antimicrobiens

L. pneumophila garantit sa survie en détournant certaines fonctions cellulaires de l'hôte comme la perturbation du trafic des vésicules, ou la reprogrammation de la voie de dégradation endosomale-lysosomale de la cellule phagocytaire. Chez l'homme, les peptides antimicrobiens (PAMs) sont des constituants majeurs de l'immunité innée au niveau des barrières anatomiques tel que l'épithélium pulmonaire. Ces PAMs représentés par le LL-37, les α -défensines (HNP1, HNP2 et HNP3) et les β -défensines (HBD-2 et -3) exercent leur activité antimicrobienne principalement par une action directe sur la bactérie. Leur principal mode d'action est la déstabilisation de la paroi bactérienne ; néanmoins, d'autres modes d'action ont été décrits comme l'interaction avec diverses cibles intra-bactériennes et la modulation du système immunitaire de l'hôte. Paradoxalement, très peu de données sont disponibles concernant l'activité des PAMs sur *Legionella*.

Notre projet a pour objectifs (i) d'identifier les mécanismes de résistance mis en jeu par les souches insensibles à l'action de ces peptides, (ii) d'identifier les mécanismes d'action des PAMs au niveau du cycle intracellulaire de *Legionella* et ceci afin de mieux appréhender le rôle de ces PAMs dans le cadre de la réponse innée lors d'une légionellose.

Nos travaux préliminaires suggèrent deux grands mécanismes d'action de ces PAMs sur l'infection par *Legionella*. Certains PAMs (LL-37 et HBD-3) présentent cet effet antibiotique endogène par une action de perméabilisation membranaire de la bactérie. Cet effet est d'intensité différente en fonction de la phase de croissance de la bactérie. Ces mêmes peptides présentent un effet inhibiteur de la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* dans des macrophages ou des pneumocytes. Le mécanisme d'action de ces peptides sur l'inhibition de la croissance intracellulaire de la bactérie est en cours de caractérisation.

LPS de *Legionella pneumophila* et réponse immunitaire innée

Objectifs : étudier la réponse immunitaire innée au LPS de *Legionella* en fonction des souches dans l'objectif d'une meilleure compréhension de la prévalence de certaines souches dans les cas de légionellose.

Le LPS de souches de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 a été obtenu par une technique d'extraction et de purification, technique mise au point par le laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Equipe Microbiologie de l'eau de Poitiers (Julien Verdon et Jean-Marc Berjeaud). Ces LPS ont été testés pour étudier la réponse immunitaire innée au LPS sur un modèle de cellules modifiées THP-1 X-Blue (lignée monocyttaire différenciable en macrophages, exprimant de manière stable une phosphatase alcaline SEAP sous contrôle d'un promoteur inductible par les facteurs de transcription du NF- κ B). Les LPS ont été extraits de souches environnementales, jamais décrites en

clinique humaine à ce jour, et différentes souches cliniques : souches fréquemment isolées en pathologie humaine (souche Paris, Lorraine, et autres souches cliniques présentant l'épitope mAb3/1+) et d'autres souches moins fréquemment impliquées dans des cas de légionellose (souches ne présentant pas l'épitope mAb3/1). Les résultats sur ce modèle cellulaire montrent une tendance à l'activation du NF-kB plus importante pour les souches environnementales ou peu impliquées en clinique que pour les souches plus pathogènes. Cette différence d'activation de l'immunité innée est en cours d'investigation sur d'autres modèles cellulaires. Elle semble cependant en faveur d'une activation plus importante de l'activité innée par des souches peu pathogènes, pouvant être à l'origine d'une meilleure clairance de ces souches.

4. LISTE DES PUBLICATIONS

4.1- PUBLICATIONS NATIONALES

1. Jamilloux Y, Jarraud S, Lina G, Etienne J, Ader F. *Legionella*, légionellose. **Med Sci** (Paris) 2012;28:639-45.
2. Legionella and Pontiac fever, **Orphanet** encyclopedia <http://www.orpha.net>, avril 2012
3. Perpoint T, Jamilloux Y, Descloux E, Ferry T, Chidiac C, Lina G, Etienne J, Jarraud S, Ader F. PCR-confirmed *Legionella non-pneumophila* meningoencephalitis. **Med Mal Infect**. 2013 Jan;43(1):32-4.
4. Campese C, Descours G, Lepoutre A, Beraud L, Maine C, Che D, Jarraud S. Legionnaires' disease in France. **Med Mal Infect**. 2015 Mar;45(3):65-71.
5. Baume M, Beraud L, Jarraud S. Impact de la nouvelle norme de détection des légionelles dans l'eau sur l'interprétation des résultats d'analyse, **Alin&as Lettre d'information** du CCLIN Sud-Est 2015
6. CIRE Rhône-Alpes – CNR des légionelles. **Bulletin de Veille Sanitaire** (BVS) Numéro spécial / Légionellose 2014. Bilan épidémiologique de la surveillance de la légionellose en Rhône Alpes, 2014, Octobre 2015

4.2- PUBLICATIONS INTERNATIONALES

2012

- Slimani S, Robyns A, Jarraud S, Molmeret M, Dusserre E, Mazure C, Facon JP, Lina G, Etienne J and Ginevra C. Evaluation of Propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR. *J Microbiol Methods* 2012; 88(2):319-2
- Ginevra C, Jacotin N, Diancourt L, Guigon G, Arquilliere R, Meugnier H, Descours G, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Caro V and Jarraud S. *Legionella pneumophila* ST1/Paris-Pulsotype subtyping by spoligotyping. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(3):696-701.
- Descours G, Suet A, Ginevra C, Campese C, Slimani S, Ader F, Che D, Lina G, Jarraud S. Contribution of amoebic coculture to the recovery of *Legionella* isolates from respiratory samples. Prospective analysis over a period of 32 months. *J Clin Microbiol*, 2012 May;50(5):1725-6
- Mekkour M, Ben Driss E, Tai J, Squinazi F, Forey F, Jarraud S, et al. molecular typing of *Legionella pneumophila* strains isolated from environment in Morocco. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2012;58 Suppl:OL1709-14.
- Atlan D, Coupat-Goutaland B, Risler A, Reyrolle M, Souchon M, Briolay J, et al. *Micriamoeba tesseris* nov. gen. nov. sp.: a new taxon of free-living small-sized Amoebae non-permissive to virulent Legionellae. *Protist* 2012;163:888-902.
- Chidiac C, Che D, Pires-Cronenberger S, Jarraud S, Campèse C, Bissery A, et al. Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France. *Eur Respir J* 2012;39:963-70.

2013

- Leclerc O, Fraisse PO, Labarraque G, Oster C, Pichaut JP, Baume M, Jarraud S, Fiscaro P, Vaslin-Reimann S. Method development for genomic *Legionella pneumophila* DNA quantification by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Biochem* 2013;435:153-8.

- Campese C, Jarraud S, Sommen C, Maine C, Che D. Legionnaires' disease in France: sensitivity of the mandatory notification has improved over the last decade. *Epidemiol Infect* 2013;1-6.
- Baume M, Garrelly L, Facon JP, Bouton S, Fraisse PO, Yardin C, Reyrolle M, Jarraud S. The characterization and certification of a quantitative reference material for *Legionella* detection and quantification by qPCR. *J Appl Microbiol* 2013. Jun;114(6):1725-33.
- Ghrairi T, Chaftar N, Jarraud S, Berjeaud JM, Hani K, Frere J. Diversity of *Legionellae* strains from Tunisian hot spring water. *Res Microbiol* 2013;164:342-50.
- Jamilloux Y, Pierini R, Querenet M, Juruj C, Fauchais AL, Jauberteau MO, Jarraud S, Lina G, Etienne J, Roy CR, Henry T, Davoust N, Ader F. Inflammasome activation restricts *Legionella pneumophila* replication in primary microglial cells through flagellin detection. *Glia* 2013;61:539-49
- Chaabna Z., Forey F., Reyrolle M., Jarraud S., Atlan D., Fontvieille D. Gilbert C, Molecular diversity and high virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from biofilms developed within a warm spring of a thermal spa. *BMC microbiology* 2013; doi : 10.1186/1471-2180-13-17
- Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. *Methods Mol. Biol.* 2013; 954:119-48.
- Jarraud S, Descours G, Ginevra C, Lina G, Etienne J. Identification of *Legionella* in clinical samples. *Methods Mol. Biol.* 2013; 954:27-56.
- Descours G, Tellini C, Flamens C, Philit F, Celard M, Etienne J, Lina G, Jarraud S. Legionellosis and lung abscesses: contribution of *Legionella* quantitative real-time PCR to an adapted followup. *Case Rep Infect Dis.* 2013;2013:190183.
- Den Boer JW, Euser SM, Nagelkerke NJ, Schuren F, Jarraud S, Etienne J. Prediction of the origin of French *Legionella pneumophila* strains using a mixed-genome microarray. *BMC Genomics.* 2013 Jul 1;14:435.
- Cassier P, Landelle C, Reyrolle M, Nicolle MC, Slimani S, Etienne J, Vanhems P, Jarraud S. Hospital washbasin water: risk of *Legionella*-contaminated aerosol inhalation. *J Hosp Infect.* 2013; 85: 308-11
- Beauté J, Zucs P, de Jong B, European Legionnaires' Disease Surveillance Network. Legionnaires' disease in Europe, 2009-2010. *Euro Surveill* 2013;18:20417.

2014

- Cassier P, Campese C, Le Strat Y, Che D, Ginevra C, Etienne J, Jarraud S. Epidemiologic characteristics associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones of Legionnaire's disease cases in France. *New Microbes New Infect.* 2014 Nov 12;3:29-33.
- Gomez-Valero L, Rusniok C, Rolando M, Neou M, Dervins-Ravault D, Demirtas J, Rouy Z, Moore RJ, Chen H, Petty NK, Jarraud S, Etienne J, Steinert M, Heuner K, Gribaldo S, Médigue C, Glöckner G, Hartland EL, Buchrieser C. Comparative analyses of *Legionella* species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. *Genome Biol.* 2014;15(11):505.
- Gomgnimbou MK, Ginevra C, Peron-Cane C, Versapuech M, Refrégier G, Jacotin N, Sola C, Jarraud S. Validation of a microbead-based format for spoligotyping of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* 2014 Jul;52(7):2410-5.
- Descours G, Cassier P, Forey F, Ginevra C, Etienne J, Lina G, Jarraud S. Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of *Legionella* species from respiratory samples. *J Microbiol Methods.* 2014 Mar;98:119-21.
- Abdel-Nour M, Duncan C, Prashar A, Rao C, Ginevra C, Jarraud S, Low DE, Ensminger AW, Terebiznik MR, Guyard C. The *Legionella pneumophila* collagen-like protein mediates sedimentation, autoaggregation and pathogen-phagocyte interactions. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Feb;80(4):1441-54.

2015

- Campese C, Descours G, Lepoutre A, Beraud L, Maine C, Che D, Jarraud S. Legionnaires' disease in France. *Med Mal Infect.* 2015 Mar;45(3):65-71.
- Beraud L, Gervasoni K, Freydiere AM, Descours G, Ranc AG, Vandenesch F, Lina G, Gaia V, Jarraud S. Comparison of Sofia Legionella FIA and BinaxNOW® Legionella urinary antigen card in two national reference centers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015 Sep;34(9):1803-7.
- Cassier P, Bénét T, Nicolle MC, Brunet M, Buron F, Morelon E, Béraud L, Descours G, Jarraud S, Vanhems P. Community-acquired Legionnaires' disease in a renal transplant recipient with unclear incubation period: the importance of molecular typing. *Transpl Infect Dis.* 2015 Oct;17(5):756-60.
- Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebel C, Timsit JF, Schneider D, Maurin M. Hidden Selection of Bacterial Resistance to Fluoroquinolones In Vivo: The Case of *Legionella pneumophila* and Humans. *EBioMedicine.* 2015 Jul 17;2(9):1179-85.

- F. Compain, P. Bruneval, S. Jarraud, S. Perrot, S. Aubert, V. Napoly, A. Ramahefasolo, J.-L. Mainardi, and I. Podglajen. Chronic endocarditis due to *Legionella anisa*: a first case difficult to diagnose. *New Microbes New Infect.* 2015 Nov; 8: 113–115.

Publication en tant qu'investigateur

Beauté J, Zucs P, de Jong B, European Legionnaires' Disease Surveillance Network. Legionnaires disease in Europe, 2009-2010. *Euro Surveill* **2013**;18:20417.

4.3- COMMUNICATIONS NATIONALES

2012

1. Suivi de la cinétique des charges bactériennes par PCR en temps réel chez les patients atteints de légionellose. Shadoud L, Recule C, Pelloux I, Croizé J, Jarraud S, Timsit JF, Maurin M. Communication orale, RICAI, 23 Novembre 2012, Paris.
2. Prévention de légionellose nosocomiale, patients « à risque » : vers le risque nul ? Reyrolle M, Gardes S, Coudrais S, Droguet J, Lina G, Girard R, Jarraud S. Communication orale, RICAI, 23 Novembre 2012, Paris.
3. Évaluation prospective de 4 milieux gélosés commerciaux pour l'isolement de *Legionella* à partir de prélèvements respiratoires. Descours G, Cassier P, Forey F, Etienne J, Lina G, Jarraud S. Communication affichée, RICAI, 23 Novembre 2012, Paris.
4. Nouvelle méthode de typage haut-débit de *Legionella pneumophila* appliquée aux dernières épidémies de légionellose dans le réseau d'eau chaude sanitaire de la ville de Rennes. Sobral D, Le Cann P, Gérard A, Jarraud S, Gardès J, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Vergnaud G, Pourcel C. Communication affichée, RICAI, 23 Novembre 2012, Paris.
5. Évaluation du réactif TRU *Legionella* (MERIDIAN) pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila*. Freydière AM, Descours G, Etienne J, Vandenesch F, Lina G, Jarraud S. Communication affichée, RICAI, 23 Novembre 2012, Paris.

2013

6. Le Cann P*, Jarraud S., Robaldo G., Guégan J.-F., Pourcel C. Stabilité spatio-temporelle des souches de *L. pneumophila* dans l'environnement. Communication orale, Sympolégio, Lyon, 26- 27 novembre 2013.
7. Descours G*, Ginevra C, Forey F, Chastang J, Jacotin N, Etienne J, Lina G, Doublet P, Jarraud S. Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides. Communication orale, 33^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 21-22 Novembre 2013, Paris.
8. Descours G*, Ginevra C, Forey F, Chastang J, N. Jacotin, J. Etienne, G. Lina, S. Jarraud. Mécanismes de résistance des légionelles aux macrolides. SympoLegio, 26-27 Novembre 2013, Lyon. SympoLegio, 26-27 Novembre 2013, Lyon.
9. P Cassier, C Ginevra, L Gomez-Valero, N Jacotin, C Buchrieser, S Jarraud and J Etienne. Specific real-time PCR for detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST47 in environmental samples. SympoLegio 2013, 26-27 Novembre 2013, Lyon
10. Freydière AM, Descours G, Vandenesch F, Lina G, Jarraud S. Evaluation du test immunochromatographique fluorescent Sofia *Legionella* FIA pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila*. Communication affichée, 33^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 21-22 Novembre 2013, Paris.
11. Jacotin N, Descours G, Forey F, Chastang J, Etienne J, Lina G, Ginevra C, Jarraud S. Détection rapide de la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides par PCR en temps réel utilisant des sondes « *sloppy molecular beacons* », Communication affichée, 33^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 21-22 Novembre 2013, Paris.
12. Le Cann P., Gérard A., Jarraud S., Loisy-Hamon F., Guégan J.F., Vergnaud G., Pourcel C. Stabilité spatio-temporelle des souches de *Legionella pneumophila* dans l'environnement. Communication affichée, 9^è congrès de la Société Française de Microbiologie, Lille, 7-8 février 2013.

2015

13. Amandine Campan-Fournier, Christine Oger, [Christophe Ginevra](#), Vincent Navratil, [Anne-Gaëlle Ranc](#), Guy Perrière and [Sophie Jarraud](#). Analysis of genomes from 32 strains of *Legionella pneumophila* of variable severity to identify determinants of pathogenicity. Journées Ouvertes en Biologie Informatique et Mathématiques (JOBIM), Clermont-Ferrand, 6-9 juillet 2015
14. C. Massip, J.V. Reynaud, J. Charavit , P.A. Billy, I. Almahmoud, [L. Béraud](#), [A.G. Ranc](#), S. Boisset, M. Maurin, [C. Ginevra](#), G. Lina, [S. Jarraud](#), [G. Descours](#). Distribution des CMI des souches de *Legionella pneumophila* résistantes et sensibles aux macrolides, aux fluoroquinolones ou à la rifampicine, communication orale, RICAI 2015, Décembre 2015
15. C. Massip, C. Gilbert, [C. Ginevra](#), P. Doublet, [S. Jarraud](#), [G. Descours](#). Deux gènes de pompe à efflux associés à une résistance aux macrolides spécifique de clones de *Legionella pneumophila*, communication affichée, RICAI 2015, Décembre 2015
16. A.G. Ranc, C. Campese, [L. Beraud](#), A. Lepoutre, [G. Descours](#), C. Maine, [C. Ginevra](#), [G. Lina](#), [S. Jarraud](#). Surveillance de la légionellose en France : retour des enquêtes épidémiologiques réalisées entre 2008 et 2014, communication affichée, RICAI 2015, Décembre 2015.
17. Amandine Campan-Fournier, Christine Oger, [Christophe Ginevra](#), Vincent Navratil, [Anne-Gaëlle Ranc](#), Guy Perrière and [Sophie Jarraud](#). Analysis of genomes from 32 strains of *Legionella pneumophila* of variable severity to identify determinants of pathogenicity. SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
18. Amandine Campan-Fournier, [Christophe Ginevra](#), Christine Oger, Frédéric Jauffrit, [Anne-Gaëlle Ranc](#), Guy Perrière et [Sophie Jarraud](#). Emergence d'un clone de *Legionella pneumophila* subsp. non-*pneumophila* ST701 ? SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
19. [Laetitia Beraud](#). Surveillance de la Légionellose en France : retour des enquêtes épidémiologiques réalisées entre 2008 et 2014. SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
20. Rôle de 2 gènes codant une putative pompe à efflux dans la résistance aux macrolides de *Legionella pneumophila*. [Clémence Massip](#). SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
21. [Sophie Jarraud](#) & [Christophe Ginevra](#). Détection pulmonaire chronique de Legionella : échecs thérapeutiques, récidives ou réinfections ?. SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
22. Olivier Challemel, Martine Adnane, Cécile Boudry, Anaïs Petit, Irene Maffre, [Sophie Jarraud](#), Christine Lawrence, Françoise Enkiri et Damien Carlier. Identification par spectrophotométrie de masse Maldi - Tof (Brucker®) d'espèces de Legionella, autres que *Legionella pneumophila* isolées à Paris et dans sa banlieue limitrophe. SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
23. Dauwalder Olivier; Ottaviani Rehane; Maffre Irène; Miclot Alexandra; De Respinis Sophie; Monnin Valérie; mailler Sandrine; Welker Martin; Durand Géraldine; Gaia Valeria; Girard Victoria; [Jarraud Sophie](#). Validation of the VITEK® MS IVD and RUO databases for *Legionella* species identification.. SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
24. [Christophe ginevra](#), [Ghislaine Descours](#), Marine Vandewalle, [Laetitia Beraud](#), [Anne-Gaëlle Ranc](#), [Gérard Lina](#) and [Sophie Jarraud](#). Complete Genome Sequences of 3 *Legionella pneumophila* isolates Using PacBio Single-Molecule Real-Time Sequencing Technology.. SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
25. [Nathalie Jacotin](#), [Christophe Ginevra](#), [Laetitia Beraud](#), [Ghislaine Descours](#) and [Sophie Jarraud](#). Hospital-acquired Legionnaires' disease cases confirmation using microbeads-based spoligotyping. SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
26. Massip C, Reynaud JV, Charavit J, Billy PA, Almahmoud I, [Beraud L](#), [Ranc AG](#), Boisset S , Maurin M , [Ginevra C](#), [Lina G](#), [Jarraud S](#), [Descours G](#). Distribution des CMI des souches de *Legionella pneumophila* résistantes et sensibles aux macrolides, aux fluoroquinolones ou à la rifampicine.. SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
27. Chefson-Girault C, Gourichon L., Pestel-Caron M., Thiberville L, [Beraud L](#), [Ranc A.G.](#), Nouvellon M. *Legionella pneumophila* : Contamination massive de l'eau d'une unité de soins localisée uniquement sur les éléments périphériques du réseau. SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
28. [Ranc Anne-Gaëlle](#), Carpentier Margot, [Beraud Laetitia](#), [Descours Ghislaine](#), [Ginevra Christophe](#), Julien Verdon, Jean-Marc Berjeaud, [Lina Gérard](#), [Jarraud Sophie](#). Comparaison des limites de détection de 3 tests de détection d'antigène urinaire par l'utilisation de lipopolysaccharide extrait de *Legionella pneumophila* sérotype 1 à 15. SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
29. Marine Vandewalle, Pierre-Alexandre Juan, Emilie Talagrand-Reboul, [Gérard Lina](#), Patricia Doublet, [Sophie Jarraud](#) and [Christophe Ginevra](#). Effect of human antimicrobial peptides against *Legionella pneumophila*. SympoLegio 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015

4.4- COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

2012

1. Le Cann P, Sobral D, Gerard A, Jarraud S, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Vergnaud G, Pourcel C. Colonisation du réseau d'eau chaude sanitaire de la ville de Rennes par une souche de *Legionella pneumophila* jamais impliquée dans une épidémie. Communication orale, Congrès Gestion de la qualité de l'eau. Sousse, Tunisie mai 2012.
2. Chaftar N, Ghrairi T, Fayçal K, Jarraud S, Berjeaud JM, Frere J, Hani K. Caractérisation de souches de *Legionella pneumophila* isolées d'eaux thermales tunisiennes. Communication orale, Congrès Gestion de la qualité de l'eau. Sousse, Tunisie mai 2012
3. Descours G, Forey F, Cassier P, Etienne J, Lina G, Jarraud S. Comparison of four commercially available media for the isolation of *Legionella* species from respiratory samples. 1st ESGLI Meeting, Dresden, Allemagne, 5-7 septembre 2012.
4. Campese C*, Jarraud S, Che D. Practices of laboratory for the diagnosis of Legionnaires' disease in France in 2010. Communication orale, 1st ESGLI Meeting, Dresden, Allemagne, 5-7 septembre 2012.

2013

5. Rusniok C, Gomez-Valero L, Ginevra C, Ma L, Bouchier C, Jarraud S, Buchrieser C Population genomics and evolution of virulence of *Legionella*. Communication orale 10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM-10). 02 October 2013 - 05 October 2013.
6. Campese C, Jarraud S, Forey F, Che D. Clusters of travel associated Legionnaires' disease in France; 2001-2012. Communication orale, 8th International conference on *Legionella*, Melbourne, Australie, 29 octobre-1er novembre 2013.
7. Le Cann P, Jarraud S, Robaldo G, Guégan J.-F, Pourcel C. Spatio-temporal stability of *Legionella pneumophila* strains in the environment. 8th International conference on *Legionella*, Melbourne, Australie, 29 octobre-1er novembre 2013.
8. Le Cann P, Gérard A, Jarraud S, Guégan J, Vergnaud G, Pourcel C. Spatio-temporal stability of *Legionella pneumophila* strains in the environment. Communication affichée 10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM-10), 2 October 2013 - 5 octobre 2013, Institut Pasteur, Paris.
9. Gomez-Valero L, Rusniok C, Reuter S, Harris S, Petty N, Jarraud S, Dougan G, Hartland H, Frankel G, Buchrieser C. The *Legionella* genus genome: comparative genomics of the entire bacterial genus. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie
10. Fuche F, Andrea C, Jarraud S, Doublet P, Gilbert C. A functional Type 1 secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie
11. C Ginevra, N Jacotin, T Geissmann, F Vandenesch, G Lina, J Etienne and S Jarraud. Influence of spacers position on CRISPR-based defense efficiency. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie
12. Descours G, Ginevra C, Forey F, Chastang J, Jacotin N, Etienne J, Lina G, Doublet P, Jarraud S. Molecular mechanisms involved in macrolide resistance in *Legionella pneumophila*. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie
13. Jacotin N, Descours G, Forey F, Chastang J, Etienne J, Lina G, Ginevra C, Jarraud S. Rapid detection of macrolides resistant *Legionella pneumophila* by use of sloppy molecular beacons in a real-time PCR assay. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie
14. Cassier P, Nicolle MC, Descours G, Benet T, Brunet F, Buron M, Morelon E, Vanhems P, Jarraud S. May oropharyngeal colonization induce Legionnaires' disease in a kidney transplant? Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie.
15. Freydière AM, Descours G, Vandenesch F, Lina G, Jarraud S. Evaluation of the Sofia *Legionella* FIA, a fluorescent immunochromatographic assay, in comparison with the BinaxNOW *Legionella* urinary antigen card. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie
16. P Cassier, C Ginevra, L Gomez-Valero, N Jacotin, C Buchrieser, S Jarraud and J Etienne. Specific real-time PCR for detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST47 in environmental samples. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie

17. MK Gomgnimbou, C Ginevra, C Peron-Cane, M Versapuech, G Refregier, N Jacotin, C Sola and S Jarraud. Transfer of *Legionella pneumophila* sequence type 1/paris pulsotype spoligotyping on a microbead-based high throughput format. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie
18. Campese C, Le Strat Y, Cassier P, Che D, Jarraud S. Epidemiological characteristics associated with specific sequence types ST1, ST23, ST47 of Legionnaires' disease cases in France, 2008-2012. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie.

2014

19. Campese C*, Descours G, Poirier R, Lhospitalier J, Che D, Jarraud S. Nuclear plants: are they a source of exposure for cases of Legionnaires' disease? 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
20. Rusniok C*, David S, Mentatsi M, Gomez-Valero L, Ginevra C, Underwood A, Jarraud S, Harrison T, Buchrieser C, Parkhill J. Whole genome sequencing identifies multiple independent recently emerged clones of *Legionella pneumophila*. 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
21. Evgeni Tsvitsivadze, Tjeerd van der Ploeg, Nico J Nagelkerke, Jeroen W Den Boer, Sophie Jarraud, Carmen Pelaz, Maria L Ricci, Maria Scaturro, Stefano Fontana, Sjoerd M Euser, Jacob Bruin, Frank Schuren. Semi-supervised domain adaptation approach for development of microarray-based data prediction models of *L. pneumophila* strains. 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
22. Jacotin N, Ginevra C, Beraud L, Descours G, Jarraud S. Hospital-acquired Legionnaires' disease cases confirmation using microbeads-based spoligotyping. 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
23. Beraud L, Maccio G, Vernet N, Descours G, Jarraud S, Freydière AM. Evaluation of the bioNexia® *Legionella* in comparison with the BinaxNOW® *Legionella* urinary antigen card : preliminary results. 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
24. Freydière AM., Gervasoni K., Descours G., Vandenesch F., Lina G., Gaia V., Jarraud S. Evaluation of the Sofia *Legionella* FIA in comparison with the BinaxNOW® *Legionella* Urinary Antigen Card in two centers. 24th ECCMID, Barcelone, Espagne, 10-13 juin 2014
25. Lück C., Jarraud S., Ehricht R., Engelmann I., Jacotin N., Meyer T., Petzold M., Slickers P., Ziegler A. and Monecke S. Microarray-based strain assignment of *Legionella pneumophila* isolates. 24th ECCMID, Barcelone, Espagne, 10-13 juin 2014
26. Descours G., Jacotin N., Forey F., Chastang J., Etienne J., Lina G., Ginevra C., Jarraud S. Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: from molecular characterization to clinical investigations. 24th ECCMID, Barcelone, Espagne, 10-13 juin 2014
27. Cassier P., Campese C., Le Strat Y., Che D., Jarraud S. Association between ST1 clone of *Legionella pneumophila* and hospital exposure: what's the trigger? 24th ECCMID, Barcelone, Espagne, 10-13 juin 2014
28. C. Rusniok, S. David, M. Mentasti, L. Gomez-Valero, S. Harris, C. Ginevra, A. Underwood, S. Jarraud, T. Harrison, C. Buchrieser, J. Parkhill. Whole genome sequencing identifies recently emerged clones of *Legionella pneumophila*. Microbiology after the genomics révolution: Genomes 2014, Institut Pasteur, Paris, France, 24-27 juin 2014
29. E. Kay, T. Sahr, C. Ginevra, C. Andrea, J. allombert, C. Gilbert, D. Schneider, P. Doublet, C. Buchrieser. Global transcriptional control of metabolism and virulence by nucleoid-associated proteins in *Legionella pneumophila*. Microbiology after the genomics révolution: Genomes 2014, Institut Pasteur, Paris, France, 24-27 juin 2014

2015

30. Christine Campese, Ghislaine Descours, Agnès Lepoutre, Laetitia Beraud, Catherine Maine, Anne-Gaëlle Ranc, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud. Clinical and environmental comparisons of Legionnaires' disease (LD) isolates in France, 2008-2014, Communication orale, ESGLI Meeting, London, UK, september 2015
31. Massip C., Gilbert C., Ginevra C., Doublet P., Jarraud S., Descours G. Role of two genes of putative efflux pump in macrolide resistance of *Legionella pneumophila*. Communication orale, ESGLI Meeting, London, UK, september 2015
32. Clémence Massip, Jean-Victor Reynaud, Joséphine Charavit, Pierre-Alain Billy, Iyad Almahmoud, Laetitia Beraud, Anne-Gaëlle Ranc, Sandrine Boisset, Max Maurin, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud, Ghislaine Descours. The broth microdilution method allows for the detection of macrolides, fluoroquinolones and rifampicin resistant *Legionella pneumophila*. Communication orale, ESGLI Meeting, London, UK, september 2015
33. Ranc Anne-Gaëlle, Carpentier Margot, Beraud Laetitia, Descours Ghislaine, Ginevra Christophe, Lina Gérard, Jarraud Sophie. Comparison of the detection limits of urinary antigen tests using extracted *Legionella pneumophila* serogroup 1 to 15 lipopolysaccharide. Communication affichée, ESGLI Meeting, London, UK,

- september 2015
34. Christophe Ginevra, Ghislaine Descours, Marine Vandewalle, Laetitia Beraud, Anne-Gaëlle Ranc, Gérard Lina and Sophie Jarraud. Complete Genome Sequences of 3 *Legionella pneumophila* isolates Using PacBio Single-Molecule Real-Time Sequencing Technology. Communication affichée, ESGLI Meeting, London, UK, september 2015
 35. Dauwalder Olivier, Ottaviani, Rehane Maffre Irène, Miclot Alexandra, De Respinis Sophie, Monnin Valérie, Mailler Sandrine, Welker Martin, Durand Géraldine, Gaia Valeria, Girard Victoria, Jarraud Sophie. Validation of the VITEK[®]MS IVD and RUO databases for *Legionella* species identification. Communication affichée, ESGLI Meeting, London, UK, september 2015.

4.5- CONFERENCES SUR INVITATION

2012

1. S. Jarraud. Impact de la surveillance des cas de légionellose sur la compréhension de la maladie, Colloque international organisé par l'association ECOMICTH et l'AAMHA. La gestion de la qualité de l'eau (réseaux et thermalisme). Sousse 21 au 23 mai 2012
2. S. Jarraud. *Legionella* sp : que faisons-nous ? Que faut-il oublier ? Le point de vue du microbiologiste. Communication orale, RICAI, 23 Novembre 2012, Paris.

2013

3. Jarraud S*. Can surveillance and control of legionellosis rely on antigen / DNA detection methods ? European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, Germany 27-30 April **2013**
4. Jarraud S*. Evaluation du risque lié aux légionelles Congrès International de la Bio-Surveillance de l'environnement, Casablanca, Maroc, 24-26 Octobre **2013**
5. Jarraud S*, Descours G, Ginevra C, Cassier P, Lina G, Etienne J. Detection of *Legionella* in clinical samples, still in need of improvement. *Legionella* 2013, 29 octobre – 1^{er} novembre **2013**, Melbourne, Australie.
6. Descours G*, Jarraud S. Formation médicale continue « Les dix erreurs à ne pas faire dans le diagnostic des légionelloses ». 33^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 21-22 Novembre **2013**, Paris.

2014

7. Descours G. Detecting *Legionella* in environmental and clinical samples. A critical review of the current methods. 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre **2014**.
8. Gérard Lina 2^{èmes} journées du GREPI, table ronde Légionellose, Chantilly, les 4 et 5 décembre **2014**
9. Jarraud S*. Les légionelloses à *Legionella* non Lp1 ; les mécanismes de résistance et les moyens de dépister la résistance aux antibiotiques, séminaire hôpital Bichat, 6 Juin **2014**.

4.6- OUVRAGE OU CHAPITRE D'OUVRAGE

Chapitre d'ouvrage en langue française

1. *Legionella* 4^{ème} REMIC 2014

Chapitre d'ouvrage en langue anglaise

2. Ginevra C. "Molecular typing of *Legionella*" du livre "Molecular typing of bacteria" (édition Humana press), **2012**
3. Jarraud S. Free-living Amoebae : An Evolutionary Crib for Emerging Pathogens, Wiley-Blackwel Editors G. Greub, Chapter 5: L. pneumophila and Legionnaires' disease: epidemiology, clinical presentation, diagnostic and treatment, 2012
4. Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. *Methods Mol. Biol.* **2013**; 954:119-48.
5. Jarraud S, Descours G, Ginevra C, Lina G, Etienne J. Identification of *Legionella* in clinical samples. *Methods*

4.7- BREVETS / PCT

Patents

Patent number(s): FR3007770-A1 ; WO2014207347-A1. Inventor(s): Maurin M, Schneider D, Shadoud L, Jarraud S, Timsit JF, Etienne J. In vitro method for detecting *Legionella pneumophila* strain resistant to fluoroquinolones comprises detecting mutation on specified position or equivalent in relation to specified amino acid sequence in DNA gyrase subunit A protein. Demande de brevet en France n° 13/56225 déposée le 27 juin 2013 (IFB 13 BJ UJF EGIO/cgf-kb).

4.8- CONTRIBUTION A DES PARTENARIATS OU COLLABORATIONS AVEC DES STRUCTURES OU INSTANCES NATIONALES OU INTERNATIONALES (EN SANTE ANIMALE OU ENVIRONNEMENTALE, OMS, ECDC, ...).

Ces informations ont été apportées aux chapitres 3.2.2 et 3.4.2.

Au niveau International et européen, nous sommes impliqués au sein de **ELDSNet (ECDC)**, ESCMID Study Group of *Legionella* Infection (**ESGLI**), the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (**EUCAST**)

Au niveau National, nous collaborons avec

- le Haut Conseil de Santé Publique (**HCSP**),
- la Direction Générale de la Santé (**DGS**),
- l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (**ANSES**),
- l'Agence française de normalisation (**AFNOR**) en tant que membre de la commission: Détection des *Legionella* – méthode alternative, AFNOR T90E, Norme XPT 90-471 puis NFT 90-471 (Maud Baume) et membre de la commission NF T90-431 Septembre 2003 : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation (Maud Baume)

5. DESCRIPTION DES DÉMARCHES QUALITÉ ET GARANTIES MISES EN ŒUVRE AU SEIN DU LABORATOIRE

5.1- ACCREDITATION

Le laboratoire de biologie médicale des Hospices Civils de Lyon est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 (accréditation COFRAC n°8-3442) et le même système de management de la qualité est appliqué à tous les services du laboratoire. De ce fait, le CNR des légionelles est en cours d'accréditation pour la détection des antigènes de *Legionella* dans les urines et la PCR *Legionella* dans les prélèvements respiratoires (extension demandée en 2015, audit du COFRAC prévu en 2016). De plus, le CNR est accrédité pour la détection des *Legionella* dans les eaux propres par culture et PCR selon la norme NF EN ISO 17025 depuis juillet 2012 (accréditation COFRAC n°1-2423).

5.2- STRUCTURE QUALITE DU LABORATOIRE

La démarche qualité est gérée au niveau du pôle d'activité par une cellule qualité centrale que dirige le responsable qualité du laboratoire de biologie médicale. Le système qualité est articulé autour des processus dits de « pilotage », de « réalisation » et « supports », pour chacun desquels il existe un pilote et des participants au groupe de travail permettant de gérer et d'améliorer le processus (Figure 30).

Cartographie des processus du LBMMS

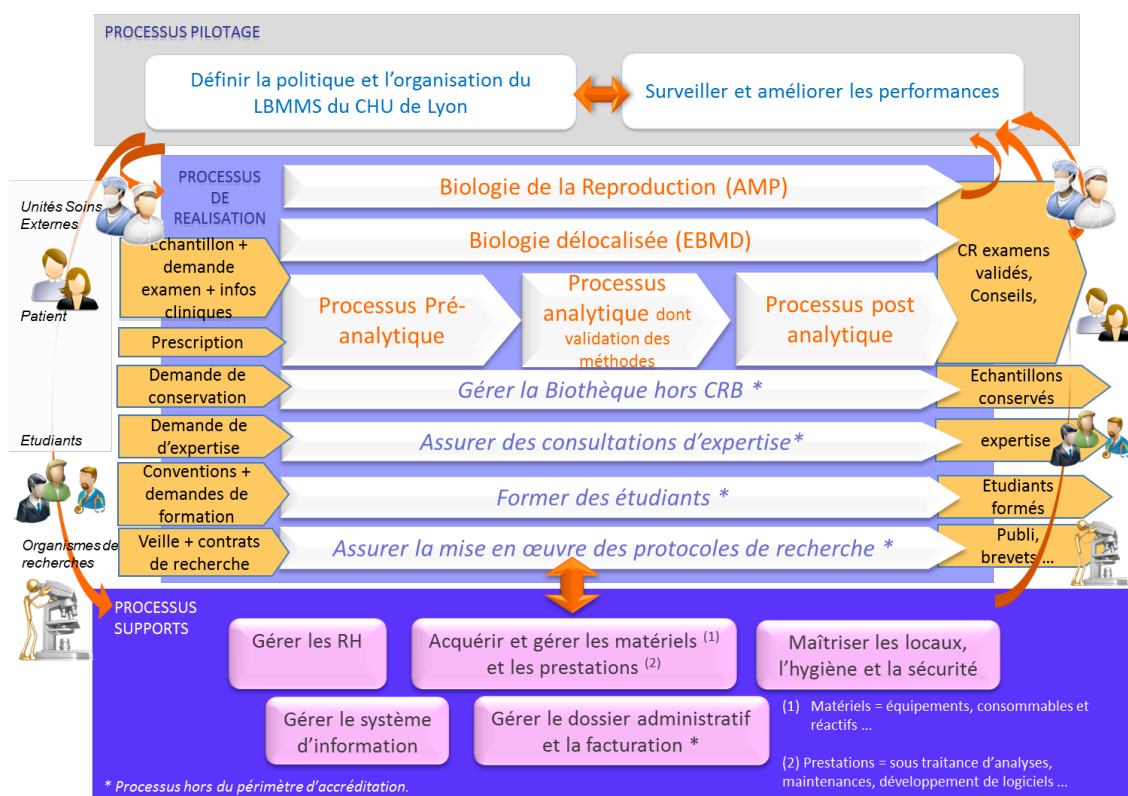


Figure 30. Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001-03)

Chaque service du laboratoire a également nommé un référent qualité qui déploie la démarche dans son secteur. Le CNR des légionelles s'appuie également sur l'ingénierie qualité affectée au CNR, notamment pour le suivi de l'accréditation des activités environnementales qui lui est propre. La figure 31 représente l'organigramme qualité du laboratoire de Bactériologie (valide en mai 2016).

Un manuel qualité (annexe 9) est disponible qui détaille l'ensemble des politiques et procédures mises en place pour répondre aux exigences d'accréditation de la biologie médicale. Il est complété par un manuel qualité spécifique pour les activités environnementales du CNR des légionelles.



Hospices Civils de Lyon

Organigramme Qualité du Laboratoire de Bactériologie

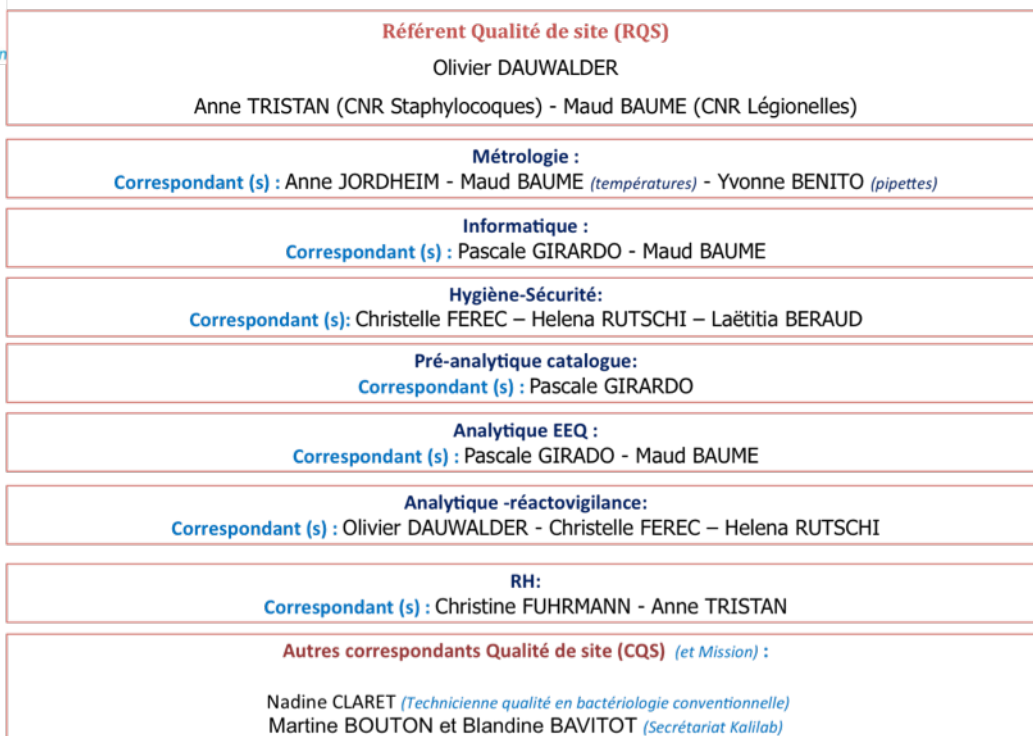


Figure 31. Organigramme qualité du laboratoire de Bactériologie

5.3- CONTROLES DE QUALITE EXTERNES (CQE)

Le CNR a participé en 2015 à 5 programmes de CQE différents concernant les analyses de *Sequence Based Typing* sur les souches de *Legionella* (contrôle européen organisé par QCMD-ECDC, 5 échantillons par an), de mise en culture et dénombrement des *Legionella* dans les eaux (contrôle européen organisé par PHE, 2 échantillons 6 fois par an), de PCR *Legionella* dans les eaux (contrôle national organisé par AGLAE, 2 échantillons 3 fois par an), de détection des antigènes urinaires et de PCR sur prélèvements pulmonaires.

Tous ces résultats (Figure 32) sont analysés et revus en réunion régulièrement. En 2015, les performances du CNR sur les CQE de mise en culture des eaux n'étaient pas satisfaisantes. Une analyse a révélée un résultat erroné en début d'année 2015 avant le transfert de la nouvelle méthode AFNOR en routine dans le laboratoire (résultat avec l'ancienne technique encore réalisée conforme) et 2 résultats non réalisés ou non saisis à temps. Les CQE rendus depuis le passage officiel à la nouvelle norme sont satisfaisants.

ESSAIS INTERLABORATOIRES : SUIVI DE LA PERFORMANCE																												
Analyse	Ag Urinaires										SBT					Eaux par culture												
Années	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2015	2009	2010	2011	2012	2014	2015	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Objectif en %						100	100	100	100	100	100	100	100	100	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Situation en %	100	97.5	100	97.5	100	97.5	100	95	96.7	100	100	80	80	100	100	-	48.2	32.4	69.4	96.61	89.58	98.6	97.2	100	97.22	99.31	97.22	58.33
Tendance	→										→					↓												

Analyse	Eaux PCR AGLAE							PCR Clinique				
Années	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2010	2011	2012	2013	2015
Objectif en %	85	80	90	90	90	90	100	80	100	100	100	100
Situation en %	77	100	90	100	90	100	100	60	90	100	90	100
Tendance	→							→				

Figure 32. Suivi des performances Qualité du CNR des Légionelles.

5.4- AUDITS

Dans le cadre de l'accréditation selon la norme 17025, le CNR des légionelles est audité annuellement depuis 2012 par des évaluateurs COFRAC pour vérifier le respect des exigences et la démarche d'amélioration continue mise en place. Ces audits ont toujours mis en avant la compétence des personnels du CNR et leur participation active dans la démarche qualité. Les évaluateurs ont à chaque fois accordée leur confiance au CNR et leurs rapports ont permis le maintien de l'accréditation (dernier audit effectué en avril 2016 pour le renouvellement de l'accréditation prévu tous les quatre ans).

De plus, des audits internes ont lieu également tous les ans, pour vérifier la mise en place du système, selon la norme 17025 et selon la norme 15189. Ils sont réalisés par du personnel du laboratoire ou de laboratoires extérieurs formé à l'audit et donnent lieu à des rapports qui nous permettent de mettre en place des actions d'amélioration.

5.5- LOGICIEL DE GESTION DE LA QUALITE

Le laboratoire dispose d'un logiciel de gestion de la qualité (Kalilab®, Netika) permettant (i) de gérer la documentation (300 documents qualité gérés pour le CNR des légionelles), (ii) de suivre les compétences du personnel (formations, évaluations et qualifications), (iii) de gérer le matériel et ses maintenances.

Ce logiciel permet également de tracer les événements indésirables (non-conformités ou réclamations) et de suivre les actions d'amélioration mises en place (plans d'actions, audits, revues, objectifs...).


Chaque personne du laboratoire a accès à ce logiciel et peut par ce biais s'impliquer dans la démarche qualité à différents niveaux.

5.6- AVANCEMENT DE LA DEMARCHE

Concernant l'accréditation des analyses de biologie médicale, l'objectif est d'accréditer l'ensemble des activités du CNR (diagnostic, identification et typage) d'ici 2020.

L'ensemble des activités font l'objet annuellement d'une revue¹ au cours de laquelle l'atteinte des objectifs et le suivi des indicateurs qualité sont exposés et les axes d'amélioration pour l'année suivante sont décidés.

¹ Plan de la revue et bilan des objectifs et indicateurs en annexe


Sommaire


Hospices Civils de Lyon

- **Suivi analytique (pré/ana/post)**
 - ✓ Revue des prescriptions, pertinence des procédures et des exigences concernant les échantillons (pré-analytique)
 - ✓ Retour d'informations des utilisateurs (réclamations, réunions,...)
 - ✓ Revue des dossiers de validation de méthodes
 - ✓ Suivi de la gestion de la portée flexible
- **Adéquation des activités et des ressources**
 - ✓ Changements apportés
 - ✓ Maintien des compétences
 - ✓ Revue documentaire
 - ✓ Evaluation des fournisseurs critiques – Bilan réactovigilance
- **Amélioration continue**
 - ✓ Suivi de la revue précédente (efficacité des actions correctives)
 - ✓ Bilan des non conformités (analytiques)
 - ✓ Résultats d'audits : internes; externes
 - ✓ Gestion des risques
 - ✓ Suggestions du personnel
 - ✓ Indicateurs du processus (dont résultats des EEQ)

➤ **Conclusion : efficacité du processus et proposition d'actions d'amélioration**

Revue de
Processus
analytique
bactériologie
12/02/2016

2



Objectifs et indicateurs qualité revus (extrait de la revue de direction 2015)

6. DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

Le CNR met en œuvre des techniques d'analyse de bactériologie conventionnelle, de sérologie infectieuse, de biologie moléculaire et de génomique. Le CNR utilise comme système de gestion de laboratoire le logiciel GLIMS et le concentrateur BioNumerics®. La Direction Générale des Hospices civils de Lyon a nommé comme Correspondant à la Protection des Données (ou Correspondant CNIL) M. Denis Rivoire (puis actuellement M. Marc Bérard), décision entérinée par la CNIL et ayant pris effet en date du 10 novembre 2006. Les systèmes de gestion de laboratoires (GLIMS) et concentrateur (BioNumerics®) relevant de la procédure de déclaration simplifiée, les HCL sont donc tout à fait dans le cadre précisé par la loi, et sont donc dispensés des formalités déclaratives auprès de la CNIL. En contrepartie, M. Marc Bérard, actuel correspondant CNIL des HCL, gère et tient à jour le registre des traitements de données nominatives mis en œuvre aux HCL. Le SGL y est enregistré sous le numéro 06-08.

La transmission des données auprès de l'InVS et de ses correspondants peut revêtir deux formes distinctes :

- la transmission de données de nature épidémiologiques construites par agrégation de données de surveillance épidémiologiques et qui sont totalement anonymes. La transmission de ces données n'est donc pas soumise à des précautions particulières relevant de la réglementation relative au traitement automatisé des données à caractère personnel,

- la transmission de données associées à un ou plusieurs patients. Le CNR, en lien avec la Direction du Système d'Information (DSII) des HCL met en place un système de transmission sécurisée dans le cadre du projet de Télémedecine développé par la DSII pour la Direction Générale des HCL. Ce projet permettra notamment un rendu des résultats et avis spécialisés sur un serveur sécurisé « MyHclPro » (via les identifiants RPPS) permettant ainsi la sécurité et la traçabilité des avis rendus. La mise en place de ce projet sera effective en 2017 au moment du démarrage réel de l'IAI.

Par ailleurs, nous avons mis en œuvre depuis plusieurs années une transmission régulière et informatisée de données vers l'InVS selon un fichier excel anonymisé.

7. PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PÉRIODE 2017-2021

Rappel du cahier des charges pour le CNR *Legionella*

1. Expertise

- en contribuant au développement de milieux de culture spécifiques et à leur évaluation ;
- en contribuant au développement et à l'évaluation des nouvelles techniques diagnostiques (moléculaires, spectrométriques) ;
- en produisant, validant et diffusant des réactifs spécifiques ;
- en contribuant au diagnostic des légionelloses, notamment celles dues aux *Legionella non pneumophila* ;
- en réalisant le typage moléculaire de toutes les souches cliniques adressées au CNR et la comparaison de leurs profils génomiques ;
- en développant et maintenant une banque de données des profils génomiques (PFGE/SBT) ;
- en réalisant le typage moléculaire des souches environnementales, lors de l'investigation des cas groupés ou pour comparaison avec les profils génomiques des souches cliniques des cas isolés ayant des expositions spécifiques ;
- en contribuant à l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux et aux biocides ;
- en contribuant à des programmes de formation continue et d'évaluation externe de la qualité afin de renforcer la capacité des laboratoires de biologie médicale dans le domaine du diagnostic et de l'identification des légionelles ;
- en contribuant à des études de recherche appliquée, notamment sur l'écologie, les facteurs de développement et de virulence de la bactérie ;
- en collaborant avec les laboratoires experts dans la surveillance de la légionellose dans l'environnement ;
- en participant au conseil auprès des professionnels de santé et de l'environnement.

2. Conseil

- en contribuant aux expertises nationales et européennes.

3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique

- en contribuant à la déclaration obligatoire de la légionellose par le signalement à l'agence nationale de santé publique des cas identifiés ou rapportés au CNR ;
- en contribuant à la détection et l'investigation de cas groupés ;
- en participant au système de surveillance européen (ELDSNet).

4. Contribution à l'alerte

- en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel : augmentation inhabituelle de cas ; apparition de cas groupés ; modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), modification des profils de résistance ; apparition de souches inhabituelles ; etc.

7.1- ACTIVITES D'EXPERTISE

7.1.1- Réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer

Au niveau national

Nos partenaires sont l'ensemble des laboratoires médicaux et des cliniciens pour le diagnostic de légionellose, les laboratoires environnementaux pour la détection environnementale ainsi que l'ensemble ARS, Délégation Territoriale, pour les investigations des cas.

Parallèlement à ces contacts quotidiens, notre objectif a été depuis plus de 10 ans de créer en France des réseaux de partenaires et de collaborations. Nous avons organisé à cette occasion le colloque national SympoLegio qui a lieu tous les 2 ans et qui permet entre autres le développement de collaborations et de relations entre scientifiques.

Le CNR collabore ainsi avec l'ensemble des équipes travaillant sur *Legionella* en France (Carmen Buchrieser, Paris ; Yann Héchard et Jean Marc Berjeaud, Poitiers ; Laurence Mathieu, Nancy ; Pierre Le Cann, Rennes ; Christine Pourcel, Paris ; Max Maurin, Grenoble ; Christine Lawrence et Jean Louis Hermann, Paris ; Bruno Pozzeto, Saint Etienne.....). Le développement de ces réseaux sera privilégié dans l'avenir.

Plusieurs collaborations nouvelles ou consolidées sont déjà programmées. Parmi celles-ci :

- sur la thématique de la sensibilité aux antibiotiques, avec le Pr Max Maurin (CHU de Grenoble)
- sur la thématique de la compréhension de l'infection et plus spécifiquement sur l'étude des facteurs associés à la sévérité de la légionellose (une vingtaine de partenaires hospitaliers et 2 partenaires de recherche fondamentale (Carmen Buchrieser, Institut Paris et Capucine Picard, Paris) (Chapitre 7.1.6.1)
- avec une équipe spécialisée dans la bio-informatique indispensable pour l'analyse des données de NGS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive - UMR CNRS 5558 Guy Perrière (Chapitre 3.6)

De plus, nous envisageons de privilégier quand cela est possible des études impliquant plusieurs laboratoires en France comme nous l'avons fait en 2016 pour une étude sur l'impact de la concentration des urines sur les résultats d'antigénurie *Legionella* ayant associé 13 centres investigateurs.

Au niveau européen et international

Nous sommes fortement impliqués dans le groupe ESGLI (European study Group of Legionella Infection) (Executive committee, S. Jarraud trésorière) avec notamment pour objectif de développer les collaborations européennes en terme d'expertise microbiologique. Nous allons être impliqués dans plusieurs études collaboratives :

- évaluation et comparaison à grande échelle de tous les tests d'antigénurie mis sur le marché, impliquant plus de 10 centres européens (coordination de l'étude en partenariat avec Valeria Gaia, CNR Suisse, et Soren Uldum, CNR Danemark)
- participation a une étude européenne sur l'identification des souches par MaldiTof
- identification des souches ST1 par PCR avec Jacob Moran-Jilab (CNR, Israël)
- identification et détection des souches ST23, ST37, ST62 et ST42 par PCR avec le PHE et Sanger Institute, UK

Des collaborations avec le PHE sont particulièrement programmées en raison du séjour de mobilité de S. Jarraud en 2016. Parmi celles-ci et en dehors des collaborations sur le typage épidémiologique, nous avons programmé :

- la mise en place de l'*Ameobae Plate Test* (APT) pour les prélèvements cliniques (Chapitre 3.2.1.2)
- une collaboration avec Valeria Gaia (Suisse), Vicki Chalker (UK) pour évaluer l'intérêt de la méthode APT pour les prélèvements environnementaux complexes

7.1.2- Les techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents en développement ou dont le développement est prévu

7.1.2.1- Techniques pour le diagnostic des cas de légionelloses

*** Un des objectifs sera de contribuer au développement du diagnostic des légionelloses, notamment celles dues aux *Legionella non pneumophila***

Depuis 2011, la positivité de la PCR *Legionella* sur un prélèvement broncho-pulmonaire permet d'établir un diagnostic probable de légionellose. Cette technique est particulièrement intéressante pour diagnostiquer les cas de légionelloses

mal / non détectées par les tests détectant la présence d'antigènes urinaires, en particulier ceux dus à d'autres espèces et sérogroupes que *Legionella pneumophila* séro groupe 1.

De nombreux dispositifs, en particulier des kits multiplex ciblant plusieurs pathogènes pulmonaires et permettant des approches syndromiques, sont actuellement sur le marché français. Les laboratoires utilisateurs nous rapportent de plus en plus de cas probables de légionellose diagnostiqués par ces dispositifs, parfois sans que cette étiologie ait été suspectée initialement. Une meilleure détection de cas de légionellose par ces techniques pourrait avoir un impact important car la mortalité est directement en relation avec la précocité du diagnostic. Néanmoins, la présence de faux positifs pourrait engendrer des notifications erronées à l'ARS, des investigations inutiles et une méfiance de ces tests de la part des utilisateurs et des cliniciens.

Plusieurs actions sont envisagées

- Nous souhaitons mettre en place une PCR développée par le CNR pour confirmer les résultats obtenus par les laboratoires expéditeurs. A l'heure actuelle, du fait de l'accréditation, nous avons privilégié comme technique de première intention l'utilisation d'un kit commercialisé évalué par le CNR. Si besoin, des analyses complémentaires pour préciser l'espèce ou le séro groupe étaient réalisés par des PCR développés par le CNR.
- Evaluer dans la mesure du possible les kits multiplexés
- Réaliser une information à l'ensemble des laboratoires de bactériologie mais également de virologie qui sont les 1ers utilisateurs de ces kits de nous envoyer en systématique tous les prélèvements positifs (non associés à une antigénurie positive).

* Etude de l'apport des approches utilisant le NGS dans le diagnostic infectieux

L'objectif est de séquencer une ou plusieurs régions spécifiques de microorganismes à partir d'un prélèvement clinique.

- une approche consiste à amplifier l'ARNr 16S et séquencer l'ensemble des amplicons en NGS ce qui permet d'identifier l'ensemble des bactéries présentes dans le prélèvement dont *Legionella*
- une autre approche est la capture ciblée de plusieurs ADN de microorganismes suivi de leur séquençage en NGS ce qui permet d'identifier l'ensemble des pathogènes recherchés.

7.1.2.2- Techniques pour l'identification des *Legionella*

* Nous continuerons à participer à l'implémentation et à la validation des bases de données MaldiTof pour l'identification des légionelles

Nous participerons notamment à une large étude européenne d'évaluation des bases de données actuelles avec des souches sélectionnées et distribuées à l'ensemble des participants.

* Développement de l'identification de l'espèce pour les légionelloses à *Legionella non pneumophila* diagnostiquée par PCR *Legionella spp.*

Alors que la PCR séquençage ciblant le gène *mip* est la méthode de référence pour identifier les *Legionella non pneumophila*, celle-ci manque de sensibilité lorsqu'elle est appliquée au prélèvement pulmonaire. C'est le cas également de la PCR 23s-5s utilisée actuellement au CNR.

Nous souhaitons développer une PCR ou Nested-PCR séquençage utilisable sur échantillon clinique.

7.1.2.3. Détection des *Legionella* dans l'environnement

* Evaluation de l'apport de la technique APT pour détecter des légionelles dans des environnements complexes

Nous avons montré l'apport indéniable de la technique de co-culture amibienne sur gélose solide (*Amoebae Plate Test*) pour l'isolement de légionelles des prélèvements pulmonaires (chapitre 3.2.1.2). L'intérêt de la co-culture réside surtout

dans la lyse des bactéries associées non intracellulaires. Nous souhaitons transférer cette méthodologie aux environnements complexes le plus souvent très riches en bactéries.

Cette méthode a été appliquée avec succès pour un prélèvement d'aérosolthérapie dans lequel pour la première fois nous avons isolée des *L. pneumophila* séro groupe 1 (la culture étant négative du fait de contamination importante). Nous avons programmé une collaboration avec le CNR Suisse (Valeria Gaïa) spécialiste de la détection de légionelles dans les sols, composts et autres environnements complexes et l'Angleterre (Public Health England).

* **Projet de nouvelle certification de l'ADN étalon par PCR digitale**

La certification initiale du lot actuel d'ADN étalon datant de 2009, il nous paraît nécessaire au vu des études de stabilité montrant une légère variabilité de la concentration d'estimer à nouveau la valeur assignée à cet étalon.

L'étude initiale avait été réalisée par dilutions limites et PCR quantitative en temps réel, estimant la valeur de l'ADN statistiquement en interprétant les données d'extinction du signal de PCR. Depuis, une méthode de quantification absolue de l'ADN a été développée ; la Digital Droplet PCR (ddPCR), qui permettrait d'estimer de façon plus directe la quantité d'ADN présente dans l'étalon.

Un projet est en cours pour étudier la faisabilité et valider la méthodologie pour quantifier l'ADN étalon de Legionella avec la méthode ddPCR afin d'assigner une nouvelle valeur plus précise.

* Depuis la description en collaboration avec le Public Health England, Sanger Institute et l'institut Pasteur Paris d'une PCR ciblant les Lp1 ST47 de façon spécifique et sensible, nous souhaitons utiliser cette PCR à plus grande échelle afin **d'identifier la/les niche(s) des Legionella ST47** qui comme nous l'avons vu sont exceptionnellement identifiées dans l'environnement.

7.1.3- Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections ;

7.1.3.1- Mode de constitution

La collection est actuellement constituée par :

- l'envoi systématique des souches d'origine clinique pour typage (circulaire du 11 juillet 2005)
- l'envoi des prélèvements pulmonaires (1) en présence d'un diagnostic de légionellose (Ag urinaire ou PCR positive), (2) en présence d'une culture positive (envoi avec la souche) et (3) si le laboratoire ne réalise pas la culture ou la PCR. Cet envoi peut être demandé par l'ARS lors d'une investigation épidémiologique
- les prélèvements et les souches de légionelles isolées de patients en échec thérapeutique peuvent être adressés au CNR pour une étude de la sensibilité aux antibiotiques.
- les sérums ayant une positivité lors du screening en ELISA ou pour confirmation du titre (en accord avec Santé Publique France)
- les urines nécessitant une expertise par le CNR

Concernant l'environnement, par :

- l'envoi des souches environnementales lors d'une investigation épidémiologique
- l'envoi de souches environnementales pour identification

Nous avons programmé de plus de reconstituer progressivement la collection des souches de référence notamment ATCC du CNR.

7.1.3.2- Mode de stockage

Le mode de stockage des échantillons et souches est résumé tableau 15.

Depuis 2014 et le changement de système informatique (passage de MOLIS à GLIMS), une attention particulière a été portée sur l'informatisation de notre souchothèque et échantillothèque.

Nous avons pour projet à court terme de nous associer au Centre de Ressources biologiques des HCL qui est situé à l'Institut des Agents Biologiques, nouveau site des CNR des Hospices Civils de Lyon.

Tableau 15. Modes de stockage de la collection du CNR

TYPE DE	Conservation	T°	Durée
Echantillons			
Respiratoires, LCR, Hémo, Biopsie,... si culture et/ou AgU et/ou PCR + si culture et/ou AgU et/ou PCR -	200 µL pour biologie moléculaire + tubes NUNC	- 20°C	Infinie
	Contenant d'origine	- 20°C	3 mois
Tout prélèvement « important »	Tubes NUNC	- 20°C	Infinie
Urine (non concentrée) + -	Tube stérile à hémolyse	- 20°C	Infinie
	Contenant d'origine	+ 5°C	3 semaines
Sérums	Tube stérile à hémolyse	- 20°C	5 ans puis ceux sélectionnés : durée infinie
Souches			
Souches extérieures	Contenant d'origine	amb.	Jusqu'aux résultats
Souches cliniques	1 émulsion dans sang de mouton	- 80°C	Infinie
	2 émulsions sur billes	- 20°C	Infinie
Souches environnement « extérieur »	2 émulsions sur billes	- 20°C	Infinie
Souches environnement - eaux HCL	2 émulsions sur billes	- 20°C	Tri / 3 ans
ADN			
ADN de souches	Microtubes	- 20°C	Infinie
ADN de prélèvements cliniques	Microtubes	- 20°C	Infinie
ADN des eaux	Microtubes	- 20°C	Infinie (après tri)
Blocs PFGE	Tubes NUNC	+ 5°C	Infinie

Les conservations de plusieurs aliquots d'un même échantillon ou souche sont réalisées dans des congélateurs différents.

Sur le plan pratique, le CNR déménagera au cours de Janvier 2017. Une attention particulière sera portée aux collections du CNR.

Le stockage sera réalisé en différentes conditions (-20°C et -80°C) et dans différents lieux de l'IAI en fonction de la fréquence d'utilisation du matériel stocké, à l'étage du CNR (principalement à -20°C), au sous-sol de l'Institut, dans une pièce de stockage (4 congélateurs -20°C et 2 congélateurs -80°C) ou hors bâtiment pour les ressources dites « mortes » dans un bâtiment prévu pour le stockage délocalisé (congélateur -20°C).

L'ensemble des congélateurs -80°C sera placé sous surveillance par sondes type SPY (logiciel SIRIUS). Concernant les congélateurs -20°C, certains seront placés sous surveillance SPY alors que d'autres seront suivis par des relevés de température classique.

Nous nous engageons à assurer la conservation des échantillons biologiques relevant de l'activité du CNR des légionelles tout au long de ce prochain mandat.

7.1.3.3- Mise a disposition des collections

Compte tenu de l'importance de la collection, CNR peut mettre à disposition un large éventail de souches et de prélèvements. Il dispose de l'ensemble des espèces et des sérogroupes de légionelles décrites.

Les souches sauvages d'origine clinique et/ou environnementale de la collection du CNR ainsi que les ADN de ces souches seront adressées aux laboratoires académiques, hospitaliers, ou environnementaux après demande motivée et sous le seul jugement des responsables du CNR.

Ces collections sont accessibles gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition) après accord et signature de la lettre d'agrément pour le transfert du matériel du CNR des légionelles qui figure en annexe 10.

Les prélèvements de patients (urines positives ou sérum positifs) peuvent être adressés anonymisés à des laboratoires médicaux hospitaliers après demande motivée dans le contexte le plus souvent de contrôle d'une technique en cours de validation et sous le seul jugement des responsables du CNR (en conformité avec le décret n° 2007-1220 du 10 août 2007).

7.1.4- Les travaux d'évaluations de techniques envisagés

7.1.4.1- Contribution à l'évaluation des méthodes PCR

Depuis 2011, la positivité de la PCR *Legionella* sur un prélèvement broncho-pulmonaire permet d'établir un diagnostic probable de légionellose. Cette technique est particulièrement intéressante pour diagnostiquer les cas de légionelloses mal / non détectées par les tests détectant la présence d'antigènes urinaires, en particulier ceux dus à d'autres espèces et sérogroupes que *Legionella pneumophila* séro groupe 1.

De nombreux dispositifs, en particulier des kits multiplex ciblant plusieurs pathogènes pulmonaires et permettant des approches syndromiques, sont actuellement sur le marché français. Les laboratoires utilisateurs nous rapportent de plus en plus de cas probables de légionellose diagnostiqués par ces dispositifs, parfois sans que cette étiologie ait été suspectée initialement. Une meilleure détection de cas de légionellose par ces techniques pourrait avoir un impact important car la mortalité est directement en relation avec la précocité du diagnostic. Néanmoins, la présence de faux positifs pourrait engendrer des notifications erronées à l'ARS, des investigations inutiles et une méfiance de ces tests de la part des utilisateurs et des cliniciens.

Plusieurs actions sont envisagées

- Démarche d'évaluation des tests PCR ciblant *Legionella* et en particulier les kits multiplexés. Jusqu'à très récemment peu de kits étaient disponibles sur le marché pour le diagnostic de légionellose. Tout comme pour les tests de détection des antigènes urinaires, pour lesquels l'évaluation du CNR est particulièrement demandée par les laboratoires utilisateurs. nous avons la volonté de participer activement à l'évaluation de ces kits.
- Réaliser une information de l'ensemble ds laboratoires de bactériologie mais également de virologie qui sont les 1ers utilisateurs de ces kits multipléxés de nous envoyer en systématique tous les prélèvements/ADN positifs (non associés à une antigénurie positive).

Ces évaluations permettront également de décrire l'incidence de la co-infection des cas de légionellose avec d'autres bactéries mais également avec des virus comme la grippe.

7.1.4.2- Evaluation des tests d'antigènes urinaires

Nous continuerons à évaluer les nouveaux kits distribués sur le territoire

Nous sommes investigateurs avec le CNR Suisse (Valéria Gaïa) d'une évaluation européenne de plus de 10 tests immunochromatographiques et de 3 tests ELISA.

Cette étude multicentrique impliquant plus de 10 centres européens est la 1ère étude qui permettra d'évaluer et de comparer les tests sur le marché sur les mêmes échantillons.

7.1.5- Les projets de transferts de techniques vers d'autres laboratoires

Le CNR est à la disposition des laboratoires académiques et hospitaliers pour les accompagner dans l'implantation locale des techniques d'identification, de caractérisation et de typage des souches de légionelles dans leur laboratoire. Cette ouverture aux transferts de technologie est aussi ouverte à nos collègues étrangers.

Les transferts de techniques se font le plus souvent dans le cadre de collaboration ou par le biais de stagiaire au laboratoire (voir la liste des stagiaires précédemment).

Nous avons débuté une collaboration avec le Dr Kahina Souami de l'Institut Pasteur d'Algérie pour le développement du diagnostic de la légionellose en Algérie et pour la mise en place d'investigation épidémiologique. Cette collaboration devrait porter sur plusieurs années.

A l'occasion du séjour de S. Jarraud au Public Health England à Londres, nous avons transféré la méthode APT pour l'isolement de *Legionella* à partir de prélèvement pulmonaire.

7.1.6- Les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR.

7.1.6.1- Etudes des facteurs associés à la sévérité des cas de légionellose.

Deux approches sont proposées.

- La première approche consiste à étudier au niveau génomique et transcriptomique des souches associées à des cas sévères (projet FRM)
- La seconde approche consiste à réaliser une grande étude translationnelle nationale en associant des données clinico-biologiques et des données de recherche fondamentale dans le cadre d'un projet ANR/DGOS

1- Analyse RNAseq à grande échelle de souches *Legionella pneumophila* en croissance intra-macrophagique (Projet FRM, 2014-2017)

Les 1^{er} résultats de ce projet ont été présentés chapitre 3.6. Les prochains mois seront consacrés à l'identification de marqueurs génomiques et à l'interprétation des analyses de RNASeq.

2- Biomarqueurs bactériens et humains d'intérêt pronostique pour les légionelloses sévères- Projet ANR/DGOS

La légionellose est caractérisée par un polymorphisme clinique et une sévérité variable; l'évolution clinique de l'infection est très variable d'un patient à l'autre, même chez les patients immunocompétents, ce qui rend son pronostic difficile à prévoir.

Peu d'études prospectives ont évalué les facteurs associés au mauvais pronostic des légionelloses et la plupart d'entre elles incluent un nombre limité de patients. Dans une étude de cohorte multicentrique française de 540 patients dans laquelle l'InVS et le CNR étaient impliqués, des facteurs de risque ont été associés à une augmentation de la mortalité telles que le sexe féminin, l'âge, le séjour aux soins intensifs, l'insuffisance rénale, une corticothérapie et un état inflammatoire objectivé par des niveaux élevés de protéine C-réactive (Chidiac et al.). La pathogenèse associée à la gravité reste mal comprise. Alors que leur implication n'a pas été formellement démontrée, certaines études suggèrent le rôle de certains facteurs comme (i) une charge bactérienne infectieuse élevée, (ii) une sélection *in vivo* de mutants résistants aux antibiotiques, (iii) une plus grande virulence de certaines souches de *Legionella*, (iv) une réponse de l'hôte insuffisante ou inadaptée, (v) une susceptibilité génétique de l'hôte, (vi) des co-infections ou (vii) un microbiote pulmonaire particulier.

Au total, en dépit de plusieurs études sur *Legionella* et la légionellose, les mécanismes impliqués dans la sévérité de l'infection sont encore incomplètement élucidés. Il n'existe pas de critères objectifs pour prédire le pronostic de l'infection et potentiellement réduire le taux de mortalité.

Dans une étude interventionnelle prospective, sur une cohorte nationale de 300 patients, nos objectifs sont d'identifier des biomarqueurs d'hôte et bactérien associés à l'évolution péjorative de la légionellose. La sévérité initiale de la légionellose sera évaluée à l'admission et l'évolution péjorative de la légionellose à différents temps par des critères composites (score SOFA, passage en réanimation, décès à J28).

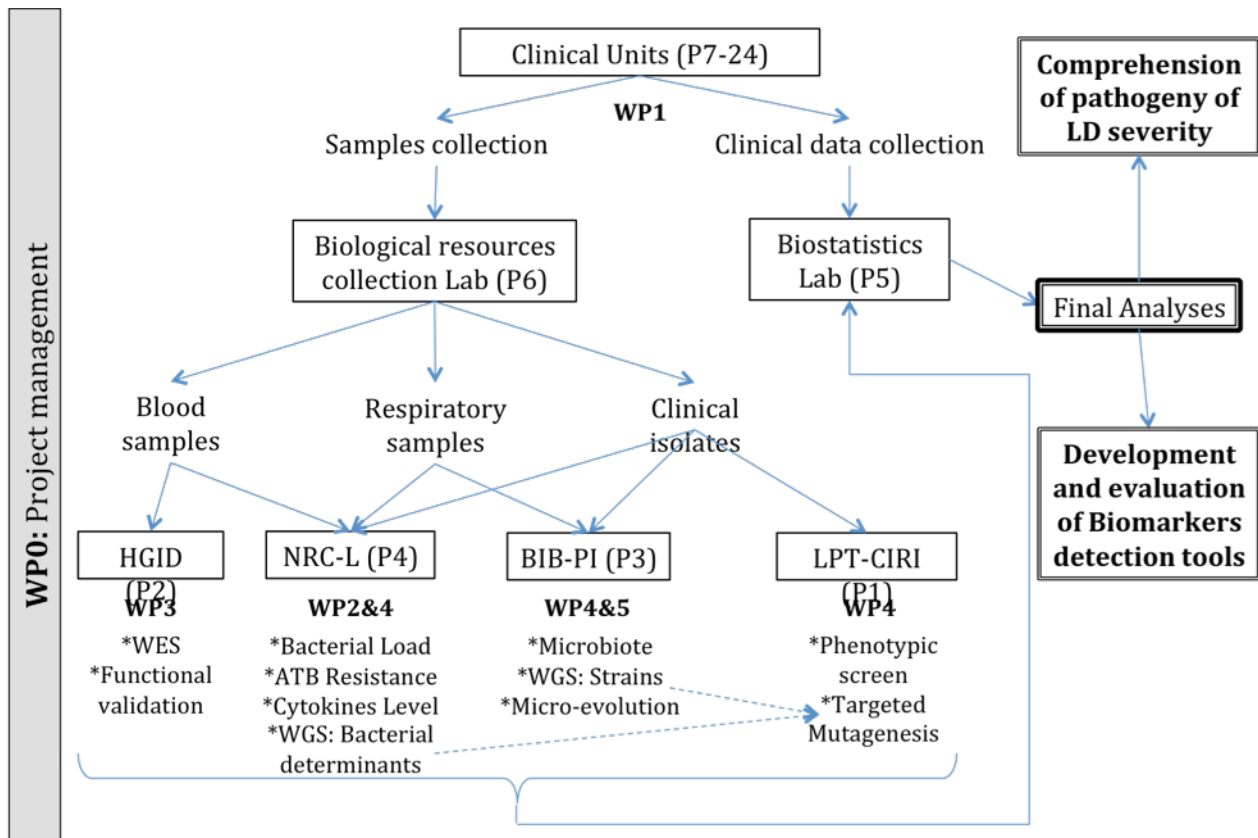
Parmi ces marqueurs de sévérité, nous souhaitons notamment étudier (Figure 33) :

- (1) si l'évolution de la charge pulmonaire en *L. pneumophila* par PCR est associée à l'évolution clinique de l'infection
- (2) l'émergence pendant le traitement d'une population de *Legionella* résistante aux antibiotiques notamment détectable par séquençage à haut débit ;
- (3) si un profil cytokinique spécifique au niveau local (pulmonaire) ou au niveau systémique (sérum) est associé à la sévérité ;
- (4) si des gènes bactériens ou des *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) sont associés à la sévérité, identifiés par des analyses génomiques comparatives ;
- (5) la diversité du microbiote pulmonaire en utilisant des approches de métagénomique et de NGS afin d'associer un microbiote spécifique ou son évolution à la sévérité de l'infection ;
- (6) les facteurs génétiques humains qui prédisposent à des infections sévères à Lp1 à l'aide d'une approche de séquençage global de l'exome ;

Le CNR sera impliqué en première ligne notamment pour favoriser l'inclusion des patients et pour les points 1 à 4. Ce projet est financé par la DGOS pour la partie en lien direct avec le CNR et l'ANR pour les questions plus fondamentales. Un technicien sera recruté par le CNR pour réaliser les analyses spécifiques à ce projet. Les inclusions doivent débutées avant la fin de l'année 2016.

Ce projet se fera en collaboration avec

- les médecins de près de 20 centres
- L'équipe *Legionella* pathogenesis, CIRI, Lyon
- Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases (HGID) (Paris Descartes University /INSERM UMR 1163, IMAGINE Institute, Necker Medical School, Paris) (Capucine PICARD).
- Unit Biology of Intracellular Bacteria, Institut Pasteur Paris (Carmen BUCHRIESER)
- Epidemiology and Infection Control Unit, Hospices Civils de Lyon (Philippe Vanhems)
- Biotechnology center of Hospices Civils de Lyon (Laurent SCHAEFFER)



HGID: Human Genetics of Infectious Diseases, NRC-L: National Reference Centre for *Legionella*, BIB-PI: Biology of Intracellular Bacteria – Pasteur Institute, LPT-CIRI: *Legionella* Pathogenesis – International Research Centre in Infectiology, WES: Whole Exome Sequencing, WGS: Whole Genome Sequencing, ATB: Antibiotics, LD: Legionnaires' Disease

Figure 33. Programme scientifique du projet ANR - Biomarqueurs bactériens et humains d'intérêt pronostique pour les légionelloses sévères

7.1.6.2- Evolution génétique de *Legionella* et évolution du microbiote au cours des récives de légionellose ou d'échecs thérapeutiques

Nous avons comme objectif de mieux caractériser les facteurs susceptibles d'être responsables des récives et/ou échecs thérapeutiques de certains cas de légionellose. Nous avons commencé par séquencer le génome d'isolats cliniques issus de ce type de patients (Chapitre 3.4.1.3). Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe Biologie des Bactéries Intracellulaires (CNRS UMR 3525, Institut Pasteur Paris), nous avons entrepris une étude pilote dans le but d'analyser la variation du microbiote pulmonaire au cours de l'infection chez ces patients de récives ou en échecs thérapeutiques. Le microbiote respiratoire est en cours de détermination pour 29 prélèvements issus de 5 de ces patients.

7.1.6.3- Diversité génétique de *Legionella* chez un même patient

L'accroissement du pouvoir discriminant des méthodes de typage par NGS pose la question du seuil permettant de différencier 2 isolats. Par exemple à partir de combien de SNPs considère-t-on que 2 isolats sont différents. Ceci amène indirectement la question de la représentativité d'un seul isolat sur la diversité génétique de la bactérie dans l'échantillon et donc chez le patient. Pour répondre à cette question, nous avons également comme projet collaboratif avec l'équipe Bactéries Intracellulaires (CNRS UMR 3525, Institut Pasteur Paris) de caractériser la diversité génétique de *L. pneumophila* au sein d'un même prélèvement respiratoire en séquençant le génome de plusieurs souches isolées du même prélèvement clinique. Dans ce but, le CNR a collecté depuis 2011, 5 à 10 colonies par prélèvement positif, ce qui constitue aujourd'hui une collection de plus de 2200 souches isolées de plus de 235 patients que nous continuons d'incrémenter. Cette étude permettra entre autre de déterminer le nombre d'isolats à analyser par patient au cours des enquêtes épidémiologiques pour être sûr de couvrir la diversité génétique bactérienne intra-patient.

7.2- ACTIVITES DE CONSEIL, FORMATION ET INFORMATION

7.2.1- projets de formation envisagés

Le CNR continuera de participer à différents programmes de formation (voir chapitre 3.3.1.1) pour permettre le renforcement du diagnostic de légionellose, de la détection environnementale et de l'investigation des cas. Il continuera à intervenir au sein de l'Institut Pasteur, Santé Publique France, les Universités (Tours, Marseille ...) dans des programmes de formation et participera aux colloques et journées de formation à la demande de différents organismes privés et publics.

7.2.2- modalités de diffusion de recommandations et informations aux professionnels concernés et les modalités prévues de rétro-information vers l'ensemble des partenaires du CNR

Pour la diffusion des conseils, des informations aux professionnels et la rétro-information des partenaires, le CNR propose de reconduire le modèle adopté jusque là en cherchant à l'améliorer : chaque demande adressée au CNR continuera à faire l'objet d'une réponse individualisée apportant le maximum d'informations afin d'améliorer la prise en charge des patients concernés ou de gérer au mieux les situations épidémiologiques rencontrées.

Un Courrier de réponse individuel et spécifique à chaque envoi de souche ou tout cas particulier sera fait avec copie à l'InVS et à l'ARS si la demande émane de l'ARS. L'amélioration portera sur le mode de transmission de ces résultats et conseils pour les laboratoires médicaux et les cliniciens qui fera appel à un système de transmission sécurisée dans le cadre du projet de Télémédecine développé par la Direction des Systèmes d'Information pour la Direction Générale des HCL. Ce système permettra un rendu des résultats, avis spécialisés du CNR et conseils sur un serveur sécurisé « MyHclPro » (via les identifiants RPPS) permettant ainsi la sécurité et la traçabilité des avis rendus. Les requérants ou demandeurs pourront adresser leur demande directement sur le site et recevront une alerte par mail les invitant à se reconnecter de manière sécurisée pour consulter la réponse rendu. La mise en place de ce projet sera effective en 2017 au moment du démarrage réel de l'IAI. Ce serveur MyHclPro ne se substituera pas au site internet du CNR (<http://cnr.univ-lyon1.fr>) qui permet la diffusion aux professionnels des modalités de fonctionnement du CNR, des bilans d'activités et publications du CNR, des enquêtes et études cliniques conduites par le CNR ainsi que les informations sur les formations et congrès.

Le site internet du CNR a été créé en 2005 (<http://cnr.univ-lyon1.fr>). Il est régulièrement mis à jour. Comme pour le site de l'étalon ADN, nous envisageons de créer quelques pages en anglais pour avoir une meilleure visibilité vis à vis de nos correspondants européens. Nous souhaitons également créer une Foire Aux Questions car nous sommes très souvent sollicités pour les mêmes questions (contrôles d'Antigènes urinaires douteux, choix des milieux pour la culture, résultats de nos évaluations de kits, modalités d'envoi, tarification...)

7.2.3- collaborations à des expertises éventuellement prévues auprès d'instances nationales ou internationales :

Nous continuerons à expertiser les cas européens déclarés par **ELDSNet** et pour lesquels une exposition à risque suspectée se situe en France.

Nous collaborerons avec toutes instances nationales ou internationales qui souhaiteront notre expertise comme nous le faisons depuis de nombreuses années (**DGS, HCSP, ANSES, AFNOR...**).

7.3- CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE

7.3.1- projets de constitution, développement et animation de réseaux de partenaires

* Au niveau national, maintien de collaboration avec les ARS autour de Santé Publique France

Sur le plan de la surveillance, le CNR a favorisé et favorisera ses relations avec les différents laboratoires de biologie médicale (aide au diagnostic, envoi de courriers réponse lors d'investigation), les laboratoires environnementaux et les différentes ARS conjointement avec Santé Publique France.

Nous organisons tous les 2 ans un colloque national SympoLegio qui permet d'échanger sur les questions en lien avec la surveillance épidémiologique mais également sur des questions relevant d'études plus fondamentales.

* Au niveau international ou européen

Nous participons à l'executive committee de ESGLI (European study Group of Legionella Infection) (trésorière, S. Jarraud depuis 2015) et nous participons activement au groupe de travail international qui s'est mis en place sur le NGS et *Legionella*. Dans ce cadre S. Jarraud a été invité par ELDSNet a présenté les premiers résultats de ce groupe au congrès ELDSNet en septembre 2016 à Amsterdam.

Sur le plan de la surveillance de la sensibilité aux antibiotiques, participation à la mise en place de la détection des la résistance aux antibiotique de *L. pneumophilla*.

Participation aux comités scientifiques des congrès européen et internationaux sur Legionella : ESGLI 2016 (européen), Legionella 2017 (international) (précédemment Legionella 2019, Legionella 2013)

7.3.2- modalités de surveillance de la résistance aux anti-infectieux et aux biocides

- **Mise à disposition des nombreux outils de détection de la résistance aux antibiotiques et favoriser l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux**

Durant ce dernier quinquennat, nous avons mis en place de nombreux outils moléculaires permettant de détecter des résistances, applicables sur souches mais également directement sur prélèvement broncho-pulmonaire, venant compléter les méthodes d'études phénotypiques. Le CNR dispose désormais de techniques NGS permettant la détection d'une sous-population résistante au sein d'une population sensible. Ces techniques sont amenées à se développer dans les années à venir.

Nous avons également définis la distribution des CMI des souches sauvages et des souches résistantes (obtenus après sélection aux antibiotiques) ce qui nous permettra d'interpréter les valeurs des CMI des souches testés et réaliser la veille sur cette question.

La résistance aux antibiotiques n'étant pas une problématique émergente pour *Legionella* a la différence de nombreux pathogènes, nous n'allons pas rechercher cette résistance sur un grand nombre de souches ou de prélèvements. Néanmoins des cas récents ont été décrits et il nous semble important de disposer d'outils pour cette surveillance. Nous promouvons l'étude de la sensibilité dès que nécessaire.

- **Caractérisation des fonctions et des mécanismes régulateurs des protéines d'efflux Lpp2879 / Lpp 2880**

Sur un plan plus de recherche a lien avec les activités du CNR, notre objectif sera de poursuivre la caractérisation du rôle des protéines d'efflux Lpp2879 / Lpp 2880 et de leurs mécanismes de régulation.

Nos travaux de recherche seront poursuivis selon plusieurs axes :

- la caractérisation du rôle de ces protéines dans l'acquisition de mécanismes de résistance additionnels tels que les mutations dans les gènes *rrl* ;
- la caractérisation des mécanismes de régulation de ces protéines en présence de macrolides à concentrations sub-inhibitrices chez la souche sauvage, mais également chez les souches présentant une région promotrice mutée (reconstruction des mutations chez la souche sauvage, RT-PCR, caractérisation des mécanismes régulateurs globaux);
- l'identification des composés de l'environnement hydrique naturel de *L. pneumophila* pouvant constituer des substrats pour la pompe à efflux : composés chlorés, métaux lourds, détergents, antiseptiques ;
- la détermination du rôle de ces protéines dans la virulence bactérienne ; pour d'autres genres bactériens, les pompes à efflux de type RND ont été identifiées comme des facteurs jouant un rôle dans l'adaptation à la niche écologique, le quorum sensing ou la virulence bactérienne, substrats de peptides anti-microbiens par exemple ;

- la caractérisation du rôle de la protéine de choc thermique CspC, codée directement en amont des gènes lpp2879 – lpp 2880 (régulation possible par des modifications de température dans l'environnement hydrique).

Ces travaux nous permettront une meilleure compréhension des mécanismes de régulation des protéines d'efflux Lpp2879 / Lpp 2880, à la fois chez les souches sauvages de *L. pneumophila* et chez les souches résistantes aux macrolides. Ils devraient également nous permettre de caractériser de nouveaux substrats impliqués dans d'autres fonctions que la résistance aux macrolides et cibles potentielles dans la lutte contre *Legionella*.

- **Evaluation et développement d'outils de détection de la sensibilité aux biocides**

Nous avons concentré nos efforts ces 4 dernières années sur la description des mécanismes de résistance des légionelles aux antibiotiques. Nous souhaitons pour les quatre prochaines années améliorer les connaissances sur la résistance de *Legionella* aux biocides. Les biocides font partie de l'arsenal thérapeutique utilisé pour lutter contre la colonisation de l'environnement par *Legionella*. Il existe de nombreuses publications montrant que certaines mutations modifiant l'expression des porines, des pompes à efflux et de régulateurs (SigB) peuvent permettre aux bactéries de devenir plus résistantes à ces molécules. Par contre, il n'existe pas encore de publications montrant formellement que l'on puisse sélectionner des souches de *Legionella* résistantes aux biocides couramment utilisés dans la lutte contre les légionelles comme le chlore, les ammoniums quaternaires, les composés phénolés, les métaux et les oxydants.

L'objectif de notre travail sera, à partir des souches de *Legionella* séquencées sensibles aux biocides de déterminer si nous arrivons à sélectionner des souches résistantes à ces molécules par passage successif sur des milieux contenant des concentrations croissantes de biocide comme nous l'avons fait pour les antibiotiques. Si nous arrivons à obtenir de telles souches, nous examinerons si cette résistance est croisée entre les différents biocides et identifierons les gènes altérés par séquençage du génome bactérien. Une fois ces gènes et mutations identifiés, nous examinerons si les souches isolées dans les environnements traités par les mêmes biocides présentent ces mutations. Ces travaux seront réalisés en zone P3 à laquelle le CNR a accès pour éviter tous risques de contamination de l'environnement par des souches de *Legionella* résistantes aux biocides.

Nous aurons également une approche plus ciblée concernant le rôle des protéines d'efflux Lpp2879 / Lpp 2880. En effet dans un travail récent (2015-2016) nous avons observé une corrélation entre la présence des protéines d'efflux Lpp2879 / Lpp2880 et certains ST (ST1, ST701 et ST proches). Les souches ST1 sont bien connues car fréquemment isolées dans l'environnement avec une distribution mondiale. Ces souches sont notamment fortement associées aux cas de légionellose acquis à l'hôpital. La raison n'a pas encore été identifiée mais une des hypothèses est que cette souche est bien adaptée à l'environnement hospitalier et possiblement aux moyens de décontamination des systèmes de réseau d'eau. Notre travail visera donc à identifier les composés, substrats de la pompe d'efflux.

7.3.3- contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels ;

Le bilan d'activité 2012-2015 montre que nous avons pu contribuer à la détection et l'investigation de cas groupés. L'identification de ces phénomènes inhabituels est possible et facilitée grâce à la mise en place de bases de données et notamment d'une base de données BioNumerics. Nous utilisons également les bases de données européennes, notamment de Sequence Based Typing du Public Health England. Nous utiliserons dans l'avenir les bases de données de génomes en cours de discussion au niveau international (groupe de travail NGS de ESGLI auxquels nous collaborons).

Nous avons également la capacité de réaliser une veille sur la résistance des légionelles aux antibiotiques même si la résistance n'apparaît pas une problématique majeure pour *Legionella*. Nous avons participé par exemple à la détection de résistance aux fluoroquinolones chez deux patients (réalisé par le groupe de Grenoble).

Enfin, grâce aux contacts avec de nombreux cliniciens et microbiologistes, nous surveillons les cas de légionelloses atypiques comme les cas extra-pulmonaires ou actuellement les cas persistants chez les populations immunodéprimées.

7.3.4- contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux ;

- * Sur le plan européen, nous participons activement au système de surveillance européen (ELDSNet) :
 - participation annuelle aux congrès ELDSNet et ESGLI
 - participation aux investigations européennes lors du diagnostic d'un cas Français au retour d'un voyage à l'étranger ou lorsqu'un établissement Français est suspecté pour un cas de légionellose étranger.
 - participation en tant que « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen pour l'ECDC. Nous avons par exemple participé aux discussions de modifications des critères européens de définition d'un cas de légionellose en 2010.
 - collaboration avec les laboratoires CNR des pays européens, notamment avec la Hollande (JP Bruin, Jeroen Den Boer), l'Angleterre (Vicki Chalker, Fry Norman, Massimo Mentasti), l'Allemagne (Christian Luck), la Suisse (Valeria Gaia),
- * Nous participons au groupe européen ESCMID sur *Legionella* (ESGLI) en étant à l'executive committee. Nous participons aux collaborations entre équipes dans ce cadre qui peuvent être en lien avec la surveillance
- * Nous participons au groupe de travail européen ESGLI sur le *Next-generation sequencing* (NGS) appliqué aux légionelles créée en Septembre 2015.

7.3.5- projets d'enquêtes ou études concourant à la surveillance.

- **Investigation du rôle de l'eau chaude sanitaire des domiciles dans la survenue des cas de légionellose.**
 Les données sur les études d'investigation des cas qui ont eu lieu de 2008 à 2014 montrent que sur les 88 investigations réalisées au domicile de patients, 67 % étaient positives, c'est à dire que la souche du patient était identique à au moins une souche isolée de son domicile. Une étude cas-temoins nationale avait été discutée il y a plusieurs années pour décrire la colonisation des ECS des habitats collectifs et individuels. Cette étude n'avait pas été menée à terme pour des raisons de conduite à tenir en cas de contamination des habitats des témoins. Le nombre de cas de légionellose ne diminue pas malgré de nombreuses mesures qui ont concernées d'abord les Tours aéroréfrigérantes puis les eaux chaudes sanitaires des lieux habitants du public. Il nous paraît important d'avoir une meilleure connaissance de l'ECS des domiciles. Santé Publique France souhaite initier une telle étude. La discussion de la mise en place d'un protocole d'étude est prévue en 2016.
- **Investigation du rôle des appareils d'aérosolthérapie / d'apnée du sommeil dans la survenue des cas de légionelloses**
 Les dispositifs d'oxygénothérapie et/ou d'aérosolthérapie comme source de contamination de cas de légionellose ont été à plusieurs reprises suspectés mais cette source potentielle n'a jamais été confirmée bactériologiquement. En collaboration avec Santé Publique France, nous souhaitons approfondir les investigations lors de légionellose survenue dans ce contexte. Très récemment (2016) nous avons isolée une souche par méthode APT d'un de ces systèmes. La souche du patient n'était pas disponible mais a été caractérisée ST1 par Nestetd SBT, tout comme la souche du dispositif. Ces investigations nécessitent une collaboration étroite entre Santé Publique France, les ARS et le CNR.
- **Impact de la météorologie pour expliquer le gradient Est / Ouest des cas de légionelloses en France.**
 Cette étude sera menée principalement par Santé Publique France mais nous pourrions être amenés à discuter les résultats.
- **Identification des sources de contamination par la souche ST47 à l'aide de la PCR mise en place**
- **caractérisation des *Legionella pneumophila* dans les pays tropicaux (Actions concertées Inter-Pasteuriennes)**
 Nous avons débuté des études collaboratives pour la détection des légionelles de l'environnement avec différents pays hors Europe notamment en Afrique et en Asie. Ces collaborations devront être renforcées et amplifiées ; elles pourraient permettre dans un objectif secondaire de comparer des souches de continents différents ayant subi des stress environnementaux différents en terme par exemple de biocides ou de traitement chloré.
 Pour l'étude pilote, une analyse des génomes a été réalisée au niveau du ST pour l'ensemble des souches de *L. pneumophila* et des SNP uniquement pour les ST1. Une analyse de génomique comparative plus poussée incluant l'ensemble des espèces de *Legionella* sera réalisée par les bioinformaticiens de l'équipe Biology of Intracellular Bacteria, Institut Pasteur Paris

7.3.6- Contribuer au développement et à l'évaluation de nouvelles techniques de typage

7.3.6.1- Typage des *Legionella pneumophila* par MALDI-TOF-MS.

Nous évaluons également une autre application potentielle de la technologie MALDI-TOF : le typage des légionelles. Le coût important du SBT et du WGS limite l'analyse d'un nombre restreint d'isolats environnementaux lors des investigations. L'objectif est de disposer d'une méthode de screening permettant d'analyser en WGS que les souches préalablement caractérisées comme potentiellement semblable par MALDI-TOF. De même ce screening pourrait avoir un intérêt pour exclure un environnement grâce à l'analyse d'un nombre plus conséquent d'isolats.

L'analyse d'un échantillon bactérien par MALDI-TOF-MS permet de générer un grand nombre de données (pics dans les profils protéiques), dont seulement une faible partie est utilisée pour l'identification bactérienne. Nous évaluons actuellement plusieurs méthodes de traitement de l'échantillon (extractions protéiques, test de différentes matrices, de différents inocula...) et d'analyse des profils protéiques obtenus (test de différents algorithmes d'analyses, de différents logiciels : Anagnostec, Bionuméric) pour évaluer le potentiel de cette technologie en matière de typage épidémiologique des légionelles.

Nos premiers résultats montrent que la méthode MALDI-TOF appliquée à 336 isolats appartenant aux 47 ST de Lp1 les plus fréquemment isolés en Europe montre des performances prometteuses, permettant la différenciation de Lp1 au niveau du Complexe Clonal.

Nous souhaitons poursuivre cette évaluation afin de pouvoir proposer dans les prochains mois cette méthodologie. Ce travail se fait en collaboration avec la société BioMérieux.

7.3.6.2- Typage des *Legionella pneumophila* par WGS

- **Choix du cgMLST comme méthode de typage des *Legionella* au niveau international - Interprétation des données**

Suite aux travaux réalisés par David S. et al. le groupe de travail ESGLI-NGS a décidé de choisir le cgMLST 50 gènes comme méthode internationale de typage des *Legionella*. En effet cette méthode atteint un haut pouvoir de discrimination de 0.990 en gardant une bonne concordance épidémiologique. Cette méthode est standardisable, évolutive et possède une nomenclature approuvée. Il a été décidé en plus de ces 50 gènes de faire un choix d'environ 1000 à 1500 gènes pour augmenter le pouvoir discriminant quand nécessaire. Nous participerons à l'évaluation internationale de ce cgMLST. Pour cela nous évaluerons des solutions « open source » telles que BIGSdb (en déploiement actuellement pour le CNR des légionelles et des staphylocoques) et SRST2, ainsi que des solutions commerciales telles que Ridom SeqSphere+ et Bionumerics.

- **Interprétation des données de WGS par cartographie des *Single Nucleotide polymorphism* (SNPs) pour l'investigation de cas groupés**

Plusieurs outils seront évalués pour l'analyse des données de WGS par des SNPs. Ce type d'analyse sera plutôt réalisé dans des contextes épidémiques. Cette analyse repose sur le mapping des reads sur une séquence de référence, suivi d'un appel de variant. BWA, Bowtie et SMALT seront évalués pour le mapping, le logiciel « naive variant caller » ainsi qu'un pipeline utilisant SAMtools, mpileup et BCFtools seront évalués pour l'appel de variant. L'impact des recombinaisons sera également évalué en utilisant le logiciel Gubbins.

Au plan technique, comme décrit précédemment, le CNR dispose d'un accès à la plateforme de séquençage génomique des HCL qui comporte notamment un séquenceur NextSeq (Illumina) et des pipelines ont été développés ou sont en train d'être testés. La transition des méthodes de SBT et PFGE vers le NGS sera réalisée progressivement au cours du prochain quinquennat avec l'objectif d'une bascule intégrale à la fin de ce mandat. Plusieurs points de vigilance sont déjà identifiés :

- la saturation des capacités de stockage des données informatiques en interne ; une réflexion institutionnelle est en cours pour l'ensemble des utilisateurs du NGS aux Hospices Civils de Lyon
- la saturation des capacités de calcul que nous externalisons (Université de Bourgogne) impliquant des coûts supplémentaires
- La saturation à prévoir des capacités de séquençage au niveau de la plateforme des HCL ; l'achat par les HCL de nouveaux équipements pourraient être une solution
- la nécessité de réaliser des investigations épidémiologiques en temps réel impliquant pour assurer des coûts raisonnables d'analyser un nombre conséquent et fréquent d'échantillons. Plusieurs solutions peuvent être

envisagées. Des contacts entre plusieurs CNR ont déjà été engagés pour discuter la nécessité de réaliser un appel d'offre nationale auprès de fournisseurs privés ou publiques qui répondraient aux exigences de chacun en terme de cout, qualité et délai de rendu des résultats.

7.3.6.3- Développement d'un Sequence Based Typing utilisant 4 gènes à la place de 7 gènes

La méthode SBT utilisant 7 gènes est devenue plus onéreuse que le WGS. Quelques pays de l'Europe vont dans les années à venir transférer l'ensemble de leur typage précédemment réalisé en SBT par WGS.

La large base de données européennes / internationales de plus de 10 000 isolats pourra néanmoins être suivis car il est possible par l'utilisation de pipeline d'extraire le Sequence Type (ST) à partir des données de WGS. Il reste néanmoins à résoudre le problème de l'un des allèles, *mompS*, qui peut être en double copie. Des pipelines sont en cours d'étude.

Dans certaines conditions il peut être intéressant d'avoir une méthode a moindre cout que le SBT actuel notamment pour les pays d'Europe qui n'ont pas la possibilité actuellement d'utiliser le WGS.

Nous avons comme objectif avec le PHE et les membres du groupe de travail NGS de proposer une méthode SBT utilisant 4 gènes avec un meilleur pouvoir de discrimination que le SBT actuel et une meilleure typabilité. Le choix des gènes est devenu possible grace aux données de plus de 500 génomes de souches connues comme étant reliés ou épidémiologiquement non reliés. Un total de 10 gènes a été sélectionné par Sophia David (Sanger Institute), le choix des 4 gènes par le groupe est en cours.

7.4- CONTRIBUTION A L'ALERTE

La contribution à l'alerte pour *Legionella* concerne principalement la suspicion de l'identification de cas groupés par les méthodes génotypiques non identifié en amont par les données d'épidémiologie clinique. L'identification de profils identiques pour plusieurs patients nous a conduits à alerter l'InVS. Cette alerte a pour but de vérifier l'absence de lien épidémiologique entre les patients et à la détection d'une nouvelle souche endémique. Nous continuerons à alerter Santé Publique France en présence de profils identiques pour plusieurs patients lorsque ce profil n'est pas connu ou peu répandu.

Nous sommes également vigilant sur les méthodes de diagnostique utilisées en France et notamment sur les kits de diagnostique distribués en France (par exemple kit de détection des antigènes urinaires ou kits PCR). Nous pourrions alerter Santé Publique France en cas de besoin comme cela a été fait il y a plusieurs années avec un kit de détection des antigènes urinaires.

L'alerte de Santé Publique France sera réalisée par téléphone et associée à un courrier électronique adressé à Agnès Lepoutre et Christine Campese. Si besoin la DGS pourra être alertée par courrier électronique à DGS-alerte (alerte@sante.gouv.fr).

De nombreuses modalités d'interface sont déjà en fonctionnement avec Santé Publique France qui permettent de gérer au mieux ces alertes car les connaissances mutuelles sont partagées tout au cours de l'année par :

- des contacts téléphoniques et/ou par courriels quasi-quotidiens avec Santé Publique France.
- la notification hebdomadaire ou quotidienne de l'ensemble des cas avec isolement de souches par fax.
- l'envoi d'informations par courriels sur la réception de prélèvements pulmonaires ou de souches lors d'investigation de cas groupés.
- la mise en place d'un fichier informatique commun à l'aide du logiciel de Voozoo est discutée depuis quelques années. Il permettrait de mettre en commun des informations utiles au deux partenaires, en s'affranchissant des recopieries de fichier à fichier. Celui ci pourrait être développé au cours de ce quinquennat. Il faciliterait encore les interactions entre Santé Publique France et le CNR.
- les rencontres physiques avec Santé Publique France sont pluri-annuelles : congrès ELDSNet et ESGLI, SympoLegio, COPIL et réunions de travail communes, et une réunion spécifique de discussion entre les membres du CNR et Santé Publique France est programmée par an.
- l'interaction de Santé Publique France et du CNR dans plusieurs projets concourant à la surveillance

CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES LEGIONELLES



HOSPICES CIVILS DE LYON
CENTRE DE BIOLOGIE EST
Institut de Microbiologie
Laboratoire de Bactériologie
59 Boulevard Pinel
69677 BRON CEDEX
FRANCE



Tél : 33 (0) 472 12 96 25
Fax : 33 (0) 472 35 73 35

Docteur Sophie Jarraud

Tél. 33 (0) 472 12 96 65

Professeur Gérard Lina

Tél. 33 (0) 472 12 96 21

Professeur Jérôme Etienne

Tél. 33 (0) 472 12 96 24

Docteur Ghislaine Descours

Tél. 33 (0) 472 12 96 64

Docteur Laetitia Beraud

Tél. 33 (0) 472 12 96 63

Docteur Anne Gaëlle Ranc

Tél. 33(0) 472 12 96 01

Email : prenom.nom@chu-lyon.fr

Réf : SJ/

Bron, le 30 Juin 2016

LETTRE D'ENGAGEMENT

Je soussignée, Sophie Jarraud, m'engage à assurer la durée du mandat en cas de nomination comme responsable scientifique du Centre National de Référence des Légionelles pour la mandature 2017 – 2021.

Fait à Lyon, le 30 Juin 2016

CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES LEGIONELLES



HOSPICES CIVILS DE LYON
CENTRE DE BIOLOGIE EST
Institut de Microbiologie
Laboratoire de Bactériologie
59 Boulevard Pinel
69677 BRON CEDEX
FRANCE



Tél : 33 (0) 472 12 96 25
Fax : 33 (0) 472 35 73 35

Docteur Sophie Jarraud

Tél. 33 (0) 472 12 96 65

Professeur Gérard Lina

Tél. 33 (0) 472 12 96 21

Professeur Jérôme Etienne

Tél. 33 (0) 472 12 96 24

Docteur Ghislaine Descours

Tél. 33 (0) 472 12 96 64

Docteur Laetitia Beraud

Tél. 33 (0) 472 12 96 63

Docteur Anne Gaëlle Ranc

Tél. 33(0) 472 12 96 01

Email : prenom.nom@chu-lyon.fr

Réf : SJ/

Bron, le 30 Juin 2016

LETTRE D'ENGAGEMENT

Je soussigné, Gérard Lina, m'engage à assurer la durée du mandat en cas de nomination comme co-responsable scientifique du Centre National de Référence des Légionelles pour la mandature 2017 – 2021.

Fait à Lyon, le 30 Juin 2016

Team 5: Legionella pathogenesis (LegioPath)

Name of team leader: Ms Patricia DOUBLET

Workforce

Team workforce	Number as at 30/06/2014	Number as at 01/01/2016
N1: Permanent professors and similar positions	6	6
N2: Permanent EPST or EPIC researchers and similar positions	1	1
N3: Other permanent staff (without research duties)	3	3
N4: Other professors (PREM, ECC, etc.)	1	1
N5: Other researchers (DREM, Postdoctoral students, visitors, etc.)		
N6: Other contractual staff (without research duties)		
TOTAL N1 to N6	11	11

Team workforce	Number as at 30/06/2014	Number as at 01/01/2016
Doctoral students	7	
Theses defended	8	
Postdoctoral students having spent at least 12 months in the unit	*	
Number of Research Supervisor Qualifications (HDR) taken	1	
Qualified research supervisors (with an HDR) or similar positions	3	3

* As defined by INSERM up to 3 years after the PhD. Three years after their PhD, they are categorized as "researcher on non permanent position"

- Detailed assessments

Assessment of scientific quality and outputs

Legionellosis is a relevant clinical entity contributing to an important proportion of community-acquired pneumonia. As a pathogen, *Legionella* is a highly interesting organism to study due to its broad spectrum of habitats, its intracellular niche (both in the environment and in the host), the broad spectrum of disease manifestation it causes, and its various - largely unresolved - pathogenic pathways.

This proposal is submitted by a recently formed research group with two PIs, resulting from a fusion of two groups in January 2013. According to their published work, the two PIs for the current proposal have two different backgrounds. The team leader has primarily published on intracellular effector kinases, and the interaction between

Legionella and the host cell, while her colleague has primarily published on clinical microbiology issues related to this agent and *Legionella* epidemiology, and the role of various strains with respect to disease.

In the past 5 years, the members of the current team have published 8 papers, with one *Microbes Infect* and one *Infect Immun* at last author position, and the others at middle positions. These papers address *Legionella* effectors (Dot/Icm) and their control, the role of the host cell cytoskeleton (here particularly the role of the LegK2 protein kinase and their role on late endosome trafficking), clinical microbiology and epidemiology. The two PIs have a very limited collaborative track record (only two joint papers). Results reported on the pathophysiology and immunopathology (CNS pathogenicity) have been senior-authored by a staff-scientist.

Short appreciation on this criterion

The combined scientific output of the two applicants is very good and refers to two quite different topics in *Legionella* research, i.e. epidemiological research and observations on the importance of certain virulence factors resulting from these epidemiological associations, and intracellular pathogen/host interaction with particular emphasis on secretion systems and effector kinases.

Assessment of the team's academic reputation and appeal

The team leader and the staff-scientists have participated at meeting-organizations, primarily regional and national (*Legionella* Rhône Alpes 2010 & 2012). They have been listed on the scientific board of international *Legionella* symposia, such as the International *Legionella* 2009 & 2013). They describe a number of sustained international collaborations with laboratories located in the USA (University of Alabama, Yale) or the UK (Cambridge & London). They obtained several national research grants (FRM, ANSES, ANR), and are members of the reviewing committee of a number of international journals (ex. *Frontiers in Microbiology*, *J Bacteriol.*)

Short appreciation on this criterion

The overall academic reputation of the team excellent and appears clearly in the top-tier of academic activities.

Assessment of the team's interaction with the social, economic and cultural environment

With respect to comparably recently established research, two patents (one international granted, one national pending), several industrial contracts, and working group participations (ANSES, Afssaps, Haut Conseil de la Santé Publique) are considered as clearly in the top level.

Short appreciation on this criterion

The overall rating for this criterion, with notably two patents, is excellent.

Assessment of the team's organisation and life

The team presentation is convincing. Of particular note, team members such as engineers, technicians, and PhD students have published at significant authorship positions (first/last), an indicator of a fair recognition of the work contribution.

Short appreciation on this criterion

The overall rating for this criterion is outstanding.

Assessment of the team's involvement in training through research

The team currently accommodates seven PhD students and four team members are involved in various training and teaching programs for PhD and Master studies. Eight PhD theses have been successfully defended since 2009 and all of these students had published research papers.

Short appreciation on this criterion

Considering group size, top-level achievements in teaching and graduate student education are excellent.

Assessment of the strategy and the five-year plan

The applicants plan to address three major research topics with the first research topic being the most prominent and most detailed.

As topic #1, it is proposed to determine Lp1 characteristics associated with *Legionella* disease (LD) severity. For the first subtopic, i.e. association of Lp1 association with disease severity, applicants plan to employ 110 isolates which they want to characterize with respect to genetic differences, and expression signals. This is likely to yield interesting results but it was not very clear which questions exactly will be addressed, which methods shall be employed to address this goal, and which collaborations or support (in particular, bioinformatics) will be recruited. Another subtopic addresses the role of the Dot/Icm secretion system. To this end, 25 Dot/Icm proteins as well as 300 effector molecules which are all regulated at different levels, will be the object of this research, yet, at this point the work program also remains somewhat vague with exception of the intention to study the role of nucleoid-associated proteins and c-diGMP in the coordination of the virulence factors at each stage of the infection process. Fis as one regulator shall be investigated using *fis* mutants, the translocation of Dot/Icm effectors will be investigated with respect to alterations of LCV trafficking, and the Dot/Icm effector mechanisms on protein kinases or host cell autophagy will be examined. Overall, this topic is extremely interesting, and it appears also to provide opportunity for collaborative research between the two PIs.

Topic #2 addresses Lp1 antimicrobial resistance and LD severity. To this end, macrolide resistance will be analysed on the basis of recognized ribosomal mutations, efflux pump alterations, and a potential role of the *fis* gene on this resistance marker. This topic is of importance, and it will contribute to our understanding of macrolide resistance in these pathogens. The Lp1 resistance to antimicrobial peptides is also subject of interest, and will be followed by a number of marker analyses for the *Legionella* life cycle.

Topic #3 addresses an interesting aspect, namely the immunological aspects already shown to be potentially involved in CNS alteration. Here, the pro-inflammatory status as determined by cytokine expression in macrophages will be monitored as well as the chemokine ligand 20 and IL-8 levels produced by epithelial cells will be measured with epithelial cells. These experiments will also be extended in co-culture assays, and it is hoped that the results (NF- κ B and IL-8 activation kinetics) will shed light on the immunological dialogue between these cell types. This is an ambitious project, and it contains precise scientific hypotheses; yet, it comprises a large programme, and will need focussing as a function of results obtained.

Short appreciation on this criterion

Taken together, the five-year plan is very good, being a mixture of important and original hypotheses and clearly planned work content.

Conclusion

- **Strengths and opportunities:**

- clinically important field;
- team involved in the research topic since many years with proven expertise in *Legionella pneumophila* cell microbiology and a sizeable yet not outstanding track record;
- availability of a large set of clinical/environmental isolates;
- combination of cell physiologic and clinical microbiology/epidemiology expertis;
- various research topics each well suited to contribute to our overall understanding of Lp pathogenesis and disease course.

- **Weaknesses and threats:**

- the collaborative added research expertise of the two groups still needs to be proven;

27

- broad area of planned research with intertwined research aspects not clearly identifiable.

▪ **Recommendations:**

The work should be pursued along the same lines with a continued effort to mix the two groups.



Département de l'Evaluation et
Du Suivi des Programmes

Evaluation des structures - VAGUE A

Tableau par équipe argumenté

CSS7

Unité COSSET François-Loïc

Equipe : DOUBLET Patricia (CSS 7)	
Items	Commentaires
Production scientifique	- Points forts : bonne production. CNR Legionelles. Contrats avec l'industrie. 2 brevets.
Positionnement International / National	- Points forts : CNR legionelles. Bonne notoriété nationale et internationale.
Spécificité, originalité du programme et compétences / Savoir-faire	- Points forts : CNR Legionelles. Spécialiste légionelles avec aspect physiopathologique et épidémiologique.
Direction et animation	- Points forts : CNR légionelles. Différentes sources de financements. Organisation de congrès internationaux.
Synergie environnement	- Points forts : collaborations avec équipe X. Charpentier
Avis CSS :	Projet d'équipe recevable
Commentaires :	Très bonne équipe, solide.



Legionella : de l'environnement à l'homme

Mardi 17 Novembre 2015

8h30 – 9h30 ACCUEIL

9h30 – 9h35 : Introduction - Ouverture des journées.

Session 1. TRANSMISSION - EPIDEMIOLOGIE

Modérateurs : Valeria Gaia / Sophie Jarraud

- 9h35 – 9h50 **Christine CAMPESE** (InVS, St Maurice) Caractéristiques épidémiologiques des cas de légionellose en 2014 en France et en Europe.
- 9h50 – 10h10 **Laetitia BERAUD** (CNR des légionelles, Lyon) Surveillance de la Légionellose en France : retour des enquêtes épidémiologiques réalisées entre 2008 et 2014.
- 10h10 – 10h30 **Christine CAMPESE** (InVS, St Maurice) Etude sur l'impact des retombées de panaches émis par les tours aéro-réfrigérantes des centres nucléaires de production électrique d'EDF sur la survenue de cas de légionellose en France de 2010 à 2012.
- 10h30 – 11h10 **Sebastian CRESPI** (Palma de Mallorca, Espagne) A convoluted outbreak. Exploring the hidden side of the moon.

11h10 – 11h50 PAUSE – SESSION POSTER

Modérateurs : Christine Lawrence / Jean Marc Berjeaud

- 11h50 – 12h10 **Emmanuelle VAISSIERE / Sébastien MAGNE** (CIRE région Auvergne, Clermont-Ferrand) Investigation d'une suspicion de cas groupés de légionellose, Aurillac (Cantal) : exploration des sources d'exposition environnementales.
- 12h10 – 12h30 **France WALLET** (Service des Etudes Médicales, EDF, Levallois Perret) Analyse probabiliste des données d'une épidémie de légionelloses : contribution à l'évaluation du risque.

12h30 – 14h30 : DEJEUNER – SESSION POSTER

Session 2. ENVIRONNEMENT

Modérateurs : Christine Lawrence / Jean Marc Berjeaud

- 14h30 – 14h50 **Sam DUKAN** (CLICK4TAG, Grand Luminy Technopole, Marseille) Nouvelle méthode rapide de dénombrement semi-quantitatif des *Legionella pneumophila* cultivables.
- 14h50 – 15h10 **Séverine ALLEGRA** (UMR 5600 EVS-ISTHME, St Etienne) Caractérisations physiques et physiologiques des aérosols de légionelles atteignant la région thoracique.

Session 3. TYPAGE ET GENOMIQUE COMPARATIVE

Modérateurs : Xavier Charpentier / Christophe Ginevra

- 15h10– 15h30 **Joël F. POTHIER** (Zurich University of Applied Sciences ZHAW, Institute of Natural Resources Sciences, Environmental Genomics and Systems Biology Research Group, Switzerland) Identification and subtyping of *Legionella pneumophila* Strains by Whole Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry (WCMS) using PAPMID (Putative Assigned Protein Masses for Identification Database).
- 15h30 – 16h00 **Sophia DAVID** (Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK) The evaluation of whole genome sequencing for the epidemiological typing of *Legionella pneumophila*.

16h00– 16h45 PAUSE – SESSION POSTER

- 16h45 – 17h15 **Laura GOMEZ VALERO** (Institut Pasteur, Biologie des bactéries intracellulaire, CNRS UMR 3525, Paris) The *Legionella* genus genome: comparative genomics of the entire bacterial genus.
- 17h15 – 17h35 **Ahmad KHODR** (Institut Pasteur, Biologie des bactéries intracellulaire, CNRS UMR 3525, Paris) Regulation of the mobility of the Lvh-genomic island of *Legionella pneumophila*.

19h00 – 23h15 : DINER – MUSEE DES CONFLUENCES

Mercredi 18 Novembre 2015

8h30 – 9h00 ACCUEIL

Session 4. AGENTS ANTI-LEGIONELLA ET RESISTANCE AU TRAITEMENT

Modérateurs : Ghislaine Descours / Max Maurin

- 9h00 – 9h30 **Jean Marc BERJEAUD** (Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Poitiers) Hypersensibilité de *Legionella* à certains biocides d'origine naturelle.
- 9h30– 9h50 **Emilie PORTIER** (Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Poitiers) Potent antimicrobial peptides against *Legionella pneumophila* and its environmental host, *Acanthamoeba castellanii*.
- 9h50 – 10h20 **Clémence MASSIP** (CNR des légionelles, Lyon): Rôle de 2 gènes codant une putative pompe à efflux dans la résistance aux macrolides de *Legionella pneumophila*.
- 10h20 – 10h40 **Max MAURIN** (Grenoble) Hidden Selection of Bacterial Resistance to Fluoroquinolones *in vivo*: the Case of *Legionella pneumophila* and Humans.
- 10h40 – 11h00 **Sophie JARRAUD / Christophe GINEVRA** (CNR des légionelles, Lyon) Place des réinfections et des récurrences au cours des légionelloses.

11h00 – 11h30 PAUSE – SESSION POSTER

Session 5. INTERACTION AVEC SES HÔTES EUCARYOTES - VIRULENCE

Modérateurs : *Christophe Gilbert / Laura Gomez-Valero*

- 11h30 – 11h50 **Luce MENGUE** (UMR CNRS 7267 Ecologie et Biologie des Interactions, Poitiers) *Legionella pneumophila* inhibe la prolifération d'*Acanthamoeba castellanii*.
- 11h50 – 12h10 **Anne VIANNEY** (Equipe pathogénie des légionelles, CIRI, Lyon) Role of cyclic-di-GMP signaling and nucleoid-associated proteins in the orchestration of bacterial effectors expression and delivery by the Dot/Icm secretion system during *Legionella* infectious cycle.
- 12h10 – 12h40 **Gunnar SCHROEDER** (Imperial College of Science, London) Proteomics approaches to dissect T4SS effector-induced host cell signalling complexes.

12h40– 14h30 : DEJEUNER – SESSION POSTER

Modérateurs : *Ahmad Khodr / Elisabeth Kay*

- 14h30 – 15h00 **Virginie LELOGEIS** (Equipe pathogénie des légionelles, CIRI, Lyon) Caractérisation de la relation entre *Legionella pneumophila* et l'autophagie de l'hôte.
- 15h00 – 15h30 : **Laetitia ATTAIECH** (Equipe "Signalisation et Génétique de la Compétence des Bactéries Pathogènes, CIRI Lyon) A FinO-like RNA chaperone and a highly conserved trans-acting sRNA control competence in *Legionella pneumophila*.
- 15h30 – 15h50 : **Pierre Alexandre JUAN** (Equipe "Signalisation et Génétique de la Compétence des Bactéries Pathogènes, CIRI Lyon) Identification du système de transformation naturelle de *L. pneumophila*.

15h50 – 16h00 Conclusion – Patricia Doublet

Cas groupés de 2011 :

- **Suspicion de cas groupés en Franche Comté – cas diagnostiqués au CH de Vesoul.**

Huit cas de légionellose ont été diagnostiqués entre fin septembre 2010 et le 19 janvier 2011 au CH de Vesoul avec isolement de souches. Dans le cadre de cette investigation épidémiologique, nous avons analysé 8 souches *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 d'origine clinique, 1 aspiration trachéobronchique par « Nested-SBT » et 1 souche environnementale Lp8 isolée au niveau d'une douche d'un logement où résidait 1 des patients. Les souches présentaient les mêmes caractéristiques pour 3 de ces patients : même profil PFGE, ST701 et sous-groupe France/Allentown. Ces caractéristiques identiques n'ont été identifiées que pour 1 autre souche de notre base de données. Il s'agissait d'une souche isolée en 2009 au CH de Dole. Aucune source de contamination potentielle n'a pu être identifiée.

- **Deux patients ayant fréquenté le même lieu**

Deux cas de légionellose (2 hommes âgés de 36 et 50 ans) nous ont été signalés par l'ARS Ile de France, DT Val d'Oise- 95. La comparaison des 2 souches *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 n'a pas mis en évidence de caractéristiques identiques. Une des souches présente les caractéristiques de la souche endémique Louisa avec un ST23 et un sous-groupe France/Allentown. La deuxième souche présente les caractéristiques de la souche endémique Lorraine avec un ST47 et un sous – groupe France/Allentown.

- **Investigation de deux cas diagnostiqués au CH de Roubaix**

Deux cas de légionellose (2 hommes âgés de 46 et 31 ans) nous ont été signalés par l'ARS Nord Pas de Calais - DT 59. La culture conventionnelle et la co-culture sur tapis ambien n'ont pas permis d'isoler de souches. Les 2 prélèvements pulmonaires ont été étudiés par « Nested SBT ». L'amplification n'a pas été possible pour l'ensemble des gènes mais les résultats des gènes séquencés ont permis d'exclure une source de contamination commune pour ces deux patients. Aucune source de contamination potentielle n'a été investiguée.

- **Investigation de deux cas ayant fréquenté un établissement thermal et le même Hôtel**

Deux patients âgés de 58 et 65 ans nous ont été signalés par l'ARS Auvergne, DT – 03 ayant fréquenté un établissement de cure thermal et ayant séjourné dans un même hôtel au cours de la cure. Nous n'avons pas confirmé à notre niveau le diagnostic de légionellose du 1er cas ; nous n'avons reçu qu'un sérum pour sérologie légionelle avec un titre d'anticorps négatif pour les différents sérogroupes de *Legionella pneumophila*. Aucun prélèvement pulmonaire n'était disponible pour typage. Pour le second patient, nous avons réalisé une Nested-SBT qui a permis d'obtenir le profil allélique suivant : 1,0,3,1,1,1,1.

- **Suspicion de cas groupés dans la région de Strasbourg.**

Huit cas de légionellose ont été diagnostiqués par le CH de Strasbourg dans une période de temps limité permettant de suspecter l'existence de cas groupés. Nous avons analysé : 6 souches d'origine clinique (6 patients âgés de 37, 80, 66, 61, et 69 ans), 5 souches *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 et 1 souche *Legionella pneumophila* séro-groupe 5 ; 2 prélèvements bronchiques et un extrait d'ADN provenant de 3 patients, par « Nested-SBT ». Aucune des souches analysées ne présentait de caractéristiques identiques : 3 souches étaient sporadiques (profil PFGE unique et appartenant à 3 ST différents, 3 souches présentaient des caractéristiques communes à d'autres souches de notre base de données. Les analyses de Nested-SBT n'ont pas permis d'identifier des identités de ST. Ces analyses n'ont pas permis de conclure à l'existence de cas groupés.

- **Suspicion de cas groupés dans la région d'Orléans.**

L'ARS du Centre DT Loiret (45) nous a signalé une augmentation du nombre de cas dans cette région entre le 21/06/2011 et le 10/07/2011. Deux patients âgés de 77 et 93 ans avaient été hospitalisés au CH d'Orléans début juillet 2011 et 2 patients âgés de 79 et 47 ans avaient été hospitalisés au CH de Montargis fin juin-début juillet 2011. Les caractéristiques de ces 4 souches étaient toutes différentes.

- **Suspicion de cas groupés diagnostiqués au CH de Dunkerque.**

Nous avons investigué 4 souches *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 isolées au CH de

Dunkerque fin juin début juillet 2011 et 1 souche environnementale *Legionella pneumophila* séro groupe 10 isolée d'une TAR industrielle proche des cas déclarés. Deux des souches d'origine clinique présentaient les caractéristiques de la souche Lorraine, les 2 autres souches étaient sporadiques (PFGE unique, ST48-sous groupe Camperdown pour l'une, ST82-sous-groupe France/Allentown pour l'autre). Les caractéristiques des souches d'origine clinique étaient différentes de celles de la souche isolée de la TAR industrielle.

- **Suspicion Cas groupés au CH de Cornouailles à Quimper**

Deux cas de légionelloses diagnostiqués pour des patients hospitalisés au CH de Cornouailles à Quimper entre fin juin et juillet 2011 nous ont été signalés car ces patients habitaient le même quartier. Les deux souches *Legionella pneumophila* séro groupe 1 isolées de ces patients présentaient des caractéristiques différentes : 1 souche PFGE sporadique ; ST96 ; sous-groupe France/Allentown et une 1 souche PFGE sporadique ; ST48 et sousgroupe Bellingham.

- **Suspicion cas groupés au CHU du Puy en Velay**

L'ARS d'Auvergne DT Haute Loire 43 nous a signalé une suspicion de cas groupés pour 2 patients hospitalisés à 1 semaine d'intervalle au CHU du Puy en Velay. Ces souches présentaient des caractéristiques différentes et aucune souche environnementale n'a été investiguée.

- **Suspicion de cas groupés en Moselle**

Signalement par la cellule CIRE- INVS Lorraine Alsace de la possibilité de 3 cas groupés. Deux souches d'origine clinique étaient disponibles mais l'analyse a montré des caractéristiques différentes. Pour le 3ème patient, la culture et la co-culture se sont révélées négatives et la « Nested SBT » n'a été positive que pour 1 gène (*asd* = 1). Des souches environnementales *L. pneumophila* séro groupe 1 ont été isolées d'un environnement compatible avec ce 3ème patient ; ces souches ST37 présentent une *asd*=1 mais ces seuls résultats ne nous ont pas permis de conclure pour cette source d'exposition.

Cas groupés de 2012 :

- **Investigation de 2 cas de légionellose en relation avec les cas groupés de l'Hôtel Diamante Beach à Calpe en Espagne**

Deux cas de légionellose (chez un couple) ayant séjourné à l'Hôtel Diamante Beach à Calpe en Espagne nous ont été signalés par le CH de Salon de Provence où ils étaient hospitalisés avec envoi d'expectorations pour recherche de légionelles. La culture conventionnelle et la co-culture sur tapis amibien n'ont pas permis d'isoler de souches. Les 2 prélèvements pulmonaires ont été analysés par Nested SBT. L'amplification n'a pas été possible pour aucun des gènes pour l'un des patients. Pour le deuxième patient, nous avons obtenu un ST 23 identique au ST des souches isolées des patients Anglais et Espagnols associés à l'épisode de cas groupés.

- **Suspicion de cas 4 groupés à Fréjus**

Quatre cas de légionellose (3 hommes et 1 femme âgés de 55, 58, 70 et 83 ans) nous ont été signalés par l'ARS Paca, DT du Var - 83. La comparaison des 4 souches *Legionella pneumophila* séro groupe 1 n'a pas mis en évidence de caractéristiques communes entre ces souches. Une des souches présente les caractéristiques de la souche endémique Mondial B avec un ST107 et un sous-groupe Philadelphia. Les autres souches sont des souches de profil PFGE sporadique avec des ST 702, 23 ou 954 et des sous-groupes France/Allentown et Knoxville. Des prélèvements environnementaux réalisés au niveau des TAR hospitalière et industrielle ont permis d'obtenir des Lp1 différentes des 4 souches cliniques investigués. Cette investigation n'a pas permis de confirmer le caractère groupé des cas.

- **Suspicion de 3 cas groupés sur la zone Aubervilliers – Pantin**

L'ARS Ile de France, Délégation Territoriale Seine Saint Denis – 93 nous a signalé trois cas de légionellose chez des patients hospitalisés dans cette région. Deux souches Lp1 présentaient les mêmes caractéristiques que la souche endémique Paris : profil PFGE Paris, ST 1, sous-groupe Philadelphia. Les caractéristiques de la souche du troisième patient étaient différentes. Du fait du caractère endémique de la souche Paris, il est difficile de conclure à une contamination commune pour ces deux cas. De plus, les souches isolées dans l'environnement au niveau de 3 TAR voisines étaient différentes des 3 souches investiguées.

- **Investigation de 3 cas groupés dans la région de Meudon**

Au cours du mois d'août 2012, trois cas de légionellose dans la région de Meudon nous ont été signalés par l'ARS Ile de France, Délégation Territoriale des Hauts de Seine – 92. Les 3 souches Lp1 isolées chez ces patients présentaient les mêmes caractéristiques : profil PFGE identique, ST 440, sous-groupe Philadelphia. L'enquête environnementale a

permis de suspecter fortement la source commune de contamination pour ces 3 cas. Il s'agissait d'une Tar industrielle ce qui n'était pas arrivé depuis plusieurs années du fait des réglementations mises en place concernant les Tars.

- **Suspicion de 5 cas groupés dans la région de Dijon**

Trois cas de légionellose avec un début des signes cliniques fin décembre 2012 nous ont été signalés par l'ARS Bourgogne pour recherche de clonalité. Les 3 souches analysées ne présentaient aucune caractéristique commune.

L'une des souches était une souche endémique Louisa, ST 23, sous-groupe France/Allentown ; la deuxième était identique à la souche Pulsotype F (future souche endémique) ST 259, sous-groupe Philadelphia et la dernière présentait un profil connu dans notre banque de données mais non endémique, ST 1 et sous-groupe France/Allentown. Deux autres cas nous ont été signalés pour lesquels la culture était négative. Nous avons réalisé une Nested-SBT du prélèvement pulmonaire dans le cadre de cette suspicion de cas groupés ; aucun des gènes analysés n'a pu être amplifié.

- **Investigation de 2 cas de contamination suspectée dans une industrie**

Il s'agit de deux salariés d'une entreprise signalés par l'ARS de Franche Comté, Délégation Territoriale du Doubs – 25. Les souches isolées chez ces deux patients sont différentes. L'une est profil PFGE sporadique - ST 40 – sous-groupe France/Allentown et l'autre profil PFGE sporadique - ST 232 – sous-groupe Olda. La souche isolée de prélèvement environnemental réalisé dans l'entreprise est différente des 2 souches cliniques.

- **Suspicion de 2 cas groupés dans la région de Clermont Ferrand**

Deux cas de légionellose fin septembre 2012 ont été signalés par l'ARS Auvergne CIRE Auvergne. Les caractéristiques des souches isolées sont différentes : l'une est profil Pulsotype E - ST 82 – sous-groupe France/Allentown et l'autre souche profil Pulsotype F - ST 259 – sous-groupe Philadelphia. Aucune source de contamination potentielle n'a été investiguée.

- **Investigation de 2 cas de légionellose diagnostiqués par antigénurie positive**

Le CH de Beaune nous a demandé de comparer 2 prélèvements de crachats réalisés en octobre 2012 pour déterminer leur possible clonalité. La culture conventionnelle et la co-culture sur tapis ambien n'ont pas permis d'isoler de souches. Les 2 prélèvements pulmonaires ont été étudiés par « Nested SBT ». Pour l'un des patients, 4 gènes sur 7 ont été amplifiés mais pour le deuxième patient aucune amplification n'a été obtenue. Nous n'avons donc pas pu réaliser la comparaison de ces 2 prélèvements.

Cas groupés de 2013 :

- **Investigation de 2 cas de légionellose à Vesoul**

Des cas de légionellose chez deux frères âgés de 75 et 76 ans nous ont été signalés par l'ARS de Franche Comté, Délégation Territoriale de Haute-Saône (70) en février 2013. Les souches de *L. pneumophila* séro-groupe 1 isolées des aspirations bronchiques réalisées chez ces patients ont été comparées à une souche isolée au niveau du robinet de lavabo de la salle de bains d'un des patients. Toutes présentaient les mêmes caractéristiques : profil PFGE sporadique identique, ST 23, sous-groupe France/Allentown. Les quatre prélèvements réalisés au niveau du matériel d'aérosolthérapie d'un des patients n'ont pas permis d'isoler de souche de Legionella. Par ailleurs, la nested-SBT réalisée sur l'un des quatre prélèvements n'a permis aucune amplification génique. Cette investigation a permis de confirmer le caractère groupé des cas et d'identifier le domicile d'un des patients comme source de contamination. Bien que le matériel d'aérosol thérapie n'ait pas été identifié comme source de contamination dans cette enquête, nous soulignons l'importance de nous adresser ces prélèvements (eau restante, masque de l'appareil, réservoir) pour la réalisation d'investigations épidémiologiques.

- **Investigation a posteriori d'un cas de légionellose diagnostiqué à Soulac sur Mer en 2012**

Suite au signalement de la présence de *Legionella pneumophila* dans le réseau d'eau chaude sanitaire d'une résidence à Soulac sur Mer en 2013, nous avons comparé la souche à d'autres souches environnementales isolées dans la même ville (autre résidence et réseau d'eau chaude sanitaire de la ville) en 2004 et à une souche isolée en 2012 chez une patiente âgée de 61 ans (cas signalé par l'ARS Aquitaine). Les souches cliniques et environnementales présentaient les mêmes caractéristiques : profil PFGE identique, ST 42, sous-groupe France/Allentown. Cette investigation n'a pas permis d'identifier avec précision le point de contamination de la patiente. Elle montre cependant la persistance de la colonisation du réseau d'eau chaude de la ville par la même souche *L. pneumophila* entre 2004 et 2013.

- **Bilan des investigations par spoligotypage**

En 2013, le CNR a utilisé la technique de spoligotypage (permettant de sous typer les souches ST1/pulsotype Paris) dans le cadre de 7 enquêtes (6 françaises et 1 suisse). Cette technique n'est actuellement disponible qu'au CNR. Les

souches isolées des sources présumées de contamination présentaient des spoligotypes identiques à ceux des patients pour les 6 enquêtes françaises, ce qui a permis de confirmer l'identification de la source de contamination. En revanche, dans l'investigation suisse, les isolats environnementaux présentaient des spoligotypes différents de ceux des souches cliniques, ne permettant pas de confirmer la source de contamination.

Cas groupés de 2014 :

- **Investigation d'une augmentation du nombre de cas associés à la même souche à Aurillac depuis 2008**

Une alerte a été lancée suite à une augmentation du nombre de cas de légionellose diagnostiqués dans la région d'Aurillac depuis 2008. Sur la période 2008-2014, 13 cas de légionellose ont été dénombrés. Une souche clinique a été isolée pour 8 d'entre eux : il s'agissait d'une souche de *L. pneumophila* séro-groupe 1, pulsotype F, ST 259 et sous-groupe Philadelphia dans 7 cas sur 8. Ces patients présentaient comme point commun soit de résider à Aurillac ; soit de résider dans un périmètre de 10-15 km et d'être venu au moins une fois à Aurillac dans la période d'incubation. Ces données font suspecter une origine de contamination commune. Des interrogatoires des cas ou de leur entourage concernant toutes les expositions possibles (grandes surfaces fréquentées, station de lavage de voiture...) ont été réalisés systématiquement pour chaque cas par l'ARS-DT15 et n'ont pas permis d'identifier d'origine commune. Les investigations se sont ensuite portées sur de potentielles sources d'exposition commune :

- il existe dans l'agglomération d'Aurillac 3 sites industriels avec 5 à 6 tours aéroréfrigérantes (TAR) connues.

L'autosurveillance de ces TAR dans le périmètre d'investigation est réalisée par les industriels. En 2013, des contrôles inopinés avaient été effectués en présence de l'inspecteur des ICPE et de l'ARS et n'avaient pas mis en évidence de dépassement de seuil réglementaire. Fin 2014, une souche environnementale (isolée en quantité inférieure au seuil) a néanmoins été adressée au CNR pour comparaison : elle présentait des caractéristiques différentes des souches cliniques ;

- Une usine de plasturgie possédant une installation avec 8 laveurs d'airs (fonctionnant sur le même principe qu'une TAR) a été identifiée et également investiguée par l'ICPE et l'ARS en 2013 sans succès. Bien qu'il n'existe pas de réglementation spécifique pour ce type d'installation, dans ce contexte, des contrôles seraient mis en place au moins 2 fois par an.

Les données recueillies pour les souches ST 259 (83 souches, principalement cliniques) dans la base de données européenne (EWGLI) montrent une prédominance en France et suggèrent une potentielle source de contamination particulière. En l'absence de source de contamination identifiée en 2014, d'autres investigations se poursuivent ou sont programmées :

- prélèvements de compost industriel ;

- campagne de prélèvements inopinés sur TAR et laveurs d'air déjà identifiés ;

- identification et investigation de potentielles TAR non répertoriées par l'ARS-DT15 en lien avec la préfecture du Cantal ;

- prélèvements dans une station d'épuration située dans le sud d'Aurillac.

Une vigilance particulière sera apportée par les différents acteurs (CNR, InVS et ARS-DT15) aux nouveaux cas déclarés en 2015.

- **Episode de cas groupés dans un établissement de santé sur plusieurs années confirmé par la méthode de spoligotypage**

Quatre cas de légionellose ont été diagnostiqués chez des patients ayant fréquenté le même service hospitalier sur une longue période : 1 cas en 2009, 1 cas en 2011 et 2 cas en 2014. Une souche était disponible pour les cas diagnostiqués en 2011 et 2014. Les souches présentaient les mêmes caractéristiques : ST 1, profil PFGE Paris, sous-groupe Philadelphia. Des souches environnementales isolées en 2009 et 2014 présentaient les mêmes caractéristiques. Cette souche étant endémique en France, la source de contamination ne pouvait être formellement identifiée, certains cas étant des cas nosocomiaux probables. La méthode de spoligotypage a permis de confirmer la source de contamination : les 3 souches d'origines cliniques (2009 et 2014) et les 2 souches environnementales (2009 et 2014) présentent le même spoligotype : SPL34. Parmi les 400 isolats ST 1 isolés dans toute la France et analysés en spoligotypage, seul un isolat issu d'une autre investigation présentait ce même spoligotype.



Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites du CHU de LYON

*Hospices Civils de Lyon
Bâtiment A
162 Avenue Lacassagne
69424 LYON Cedex 03*

Tel : 04 72 11 51 72

Fax : 04 72 11 51 79

MANUEL QUALITE

Référentiels NF ISO EN 15189 et NF ISO EN 22870

Diffusion contrôlée

Diffusion non contrôlée



Ce document ne peut être reproduit sans l'autorisation du laboratoire

Référence Kalilab : MU-POL-MQ-001-03

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION	6
PRESENTATION DU LABORATOIRE	7
ORGANISATION DU LABORATOIRE	10
A / DEFINIR LA POLITIQUE ET L'ORGANISATION DU LBMMS	12
A1. Politique qualité et engagement de la direction	13
A2. Organisation des responsabilités	13
A3. Organisation de la qualité au LBMMS	15
A4. Communication et éthique	16
A4.1 Communication interne	16
A4.2 Communication avec les professionnels de santé	16
A4.3 Communication avec les patients	18
A4.4 Ethique	18
B / SURVEILLER ET AMELIORER LES PERFORMANCES	19
B1. Satisfaction clients	20
B2. Suivi des indicateurs	21
B3. Gestion des audits internes	21
B4. Maîtrise des non-conformités	21
B5. Gestion des actions correctives et préventives	22
B6. Revue de processus et revue de direction	23
C / PRE-ANALYTIQUE	24
D / ANALYTIQUE	26
E / POST-ANALYTIQUE	28
F / BIOLOGIE DELOCALISEE	30
G / GERER LES RESSOURCES HUMAINES	33
H / GERER LE SYSTEME D'INFORMATION	35
H1. Maîtrise de la documentation	35
H2. Maîtrise du système informatique	37

Ce document ne peut être reproduit sans l'autorisation du laboratoire (MU-POL-MQ-001-03)

Laboratoire de Biologie Médicale Multi sites du CHU de LYON

MANUEL QUALITE

Version : 03

Référentiels NF ISO EN 15189 et NF ISO EN 22870

Page 3/50

I / ACQUERIR ET GERER LES MATERIELS ET LES PRESTATIONS	38
I1. Maîtrise des achats	39
I2. Maîtrise des matériels, réactifs et prestations	40
I3. Sous-traitance	41
J / MAITRISER LES LOCAUX, L'HYGIENE, ET LA SECURITE	42
K / PROCESSUS HORS PERIMETRE D'ACCREDITATION	44
K1. Gérer le dossier administratif et la facturation	44
K2. Assurer la mise en œuvre des protocoles de recherche	45
K3. Gérer la Biothèque hors Centre de Ressources Biologiques des HCL	45
K4. Assurer des consultations d'expertises	45
K5. Former des étudiants	46
ANNEXE 1- POLITIQUE QUALITE DU LBMMS DU CHU DE LYON	47
ANNEXE 2- DOMAINES, SOUS DOMAINES et familles du LBMMS du CHU de Lyon	49
ANNEXE 3- Corrélation NF EN ISO 15189 et MAQ	50

Version : 01	Date d'application : 01/06/2013
Version : 02	Date d'application : 15/05/2014
Version : 03	Date d'application : kalilab
Motif de révision : Mise à jour	
Rédaction : PILOTES DE PROCESSUS	
Vérification : Mylène GADOUX, RAQ LBMMS	
Approbation : Pr Claude NEGRIER, Biologiste responsable du LBMMS, Chef de Pôle Activité Médicale Biologie et Anatomie et Cytologie Pathologiques	

Ce document ne peut être reproduit sans l'autorisation du laboratoire (MU-POL-MQ-001-03)

INTRODUCTION

Le manuel qualité présente les dispositions générales adoptées et mises en œuvre par le laboratoire pour obtenir et garantir la qualité de ses prestations conformément aux exigences de la réglementation en vigueur et aux exigences des normes NF EN ISO 15189, NF EN ISO 22870, NF EN ISO 17025.

Il décrit notamment l'organisation du laboratoire, ses différents types d'activités et les dispositions mises en place et appliquées systématiquement en matière d'assurance de la qualité.

Il s'adresse à la structure interne, aux clients, prescripteurs, correspondants, partenaires, auditeurs...

Il s'applique, pour les phases pré-analytique, analytique, et post-analytique dans les installations permanentes du laboratoire, sur les secteurs suivants : Biochimie, Génétique, Hématologie, Immunologie, Microbiologie, ainsi que pour les examens de biologie médicale réalisés en anatomie et cytologie pathologiques et en assistance médicale à la procréation.

Le manuel qualité est tenu à jour sous l'autorité et la responsabilité du responsable qualité du laboratoire.

La vérification et l'approbation de ce manuel garantissent la cohérence sur le fond et sur la forme des dispositions qui y sont décrites avec la réglementation, les exigences normatives et les autres documents du laboratoire.

Ce manuel qualité est diffusé sous la responsabilité de la Direction via le mode de diffusion adapté.

Les modifications effectuées sont approuvées par la direction. L'objet des modifications est indiqué sur la page de garde du manuel qualité.

Le manuel qualité fait partie de la documentation du système qualité du laboratoire. Il est soumis, de fait, aux exigences de la procédure de gestion documentaire.



Dans la suite du manuel, ce logo fait référence aux procédures, documents associés dont les enregistrements, qui précisent les dispositions de maîtrise de l'activité.



Dans la suite du manuel, ce logo fait référence aux documents disponibles sur le site des HCL (intranet ou internet)



MU-POL-MQ-001 : Manuel Qualité du LBMMS

**Lettre d'agrément pour le transfert de matériel
du Centre National de Référence des Légionelles**
(A faire en double exemplaire)

En réponse de la requête émise par :

désigné Demandeur
du matériel :

au Centre National de Référence des Légionelles désigné CNRL.

Le CNRL demande que le Demandeur accepte que :

- Le Matériel fournis par le CNRL reste la propriété du CNRL et qu'il est mis à la disposition du Demandeur pour ses activités.
- Le Matériel est utilisable pour l'enseignement et la recherche à but non lucrative.
- Le Matériel ne pourra pas être redistribué par le Demandeur à un tiers autre que les collaborateurs impliqués dans la réalisation du programme de travail et travaillant directement sous l'autorité du responsable du laboratoire destinataire. Toute demande sera automatiquement signalée au CNRL et le transfert ne pourra se faire qu'après signature d'une Lettre d'agrément pour transfert de matériel avec le nouveau Demandeur et le CNRL.
- Les deux parties s'engagent à garder confidentielles toutes les informations transmises oralement, par écrit ou de toute autre manière, dans le cadre du présent Accord et se rapportant au MATERIEL. Ces INFORMATIONS ne pourront pas être communiquées à des tiers sans autorisation préalable et écrite.
- Le Demandeur informera le CNRL, de manière régulière et confidentielle, des résultats de ses travaux obtenus avec ou à partir du MATERIEL.
- Conformément aux usages scientifiques en vigueur, toutes les publications ou communications ayant trait à l'utilisation du MATERIEL font référence à l'origine CNRL. De même, la contribution des agents CNRL ayant rendu le MATERIEL accessible sera mentionnée expressément dans toutes les publications ou communications, soit par remerciements, soit en qualité de co-auteurs.
- Le CNRL est reconnu comme le propriétaire exclusif du MATERIEL et des droits de propriété intellectuelle afférents.
- Il est expressément convenu entre les Parties que le droit d'utilisation du MATERIEL concédé au titre du présent Accord ne peut, en aucun cas, être interprété comme conférant, de manière expresse ou implicite, à un quelconque droit ou titre de propriété, ou option ou licence sur le MATERIEL fourni par le CNRL.
- Au cas où les résultats obtenus seraient susceptibles de conduire au dépôt d'une demande de titre de propriété industrielle, les Parties décideront d'un commun accord de la stratégie à mettre en œuvre en matière de protection et d'exploitation de ces résultats et, le cas échéant, des personnes habilitées à procéder à un tel dépôt et/ou à une telle exploitation.
- Le Demandeur reconnaît que Matériel est de nature expérimentale et que le CNRL ne donne aucune garantie, quant à son état, son activité, son utilité, son efficacité, sa pureté, son innocuité, sa non-toxicité, sa sécurité, quant à son utilisation, sa valeur commerciale ou sa conformité à un quelconque but.
- Le demandeur est seul responsable de tout risque ou dommage pouvant découler de l'exécution du présent Accord, notamment en cas de blessure, mort, dommage matériel ou tout autre sinistre ou préjudice pouvant résulter de l'usage, des essais ou de la manipulation du MATERIEL.
- Le Demandeur s'engage à utiliser le Matériel selon les lois et réglementations en cours.
- Le Matériel est fournis gratuitement.

Le Demandeur et le CNRL, par le biais de personnes autorisées, doivent signer chacune les deux copies, une copie signé étant garder par le Demandeur et l'autre par le CNRL.

Le Centre National de Référence des Legionelles
Nom de la personne autorisée :
En qualité de :

Organisation : Centre National de Référence des Legionelles,
Adresse : Centre de Biologie et Pathologie Est, 59 boulevard Pinel, 69500 Bron

Signature

Le Demandeur
Nom du la personne :
Organisation :
Adresse :

Signature

Date