

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique  
جامعة سعد دحلب البليدة (1)  
Université SAAD DAHLEB-Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie  
Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV  
Filière : Science biologique  
Option : Microbiologie

## Thème

**Isolement identification et profil de résistance des légionelles  
dans les eaux chaudes**

*Présenté par :*

*Soutenu le : 02/07/2024*

Nom et prénom Tahar Djebbar Rayane

Nom et prénom Bounedjar Aya

Devant le jury :

Nom	Grade/Lieu	Qualité
Mme Nom EDDAIKRA A.	MCB /USDB1	Présidente
Mme Nom BOKRETA S.	MCB/USDB1	Examinatrice
Ms BENEDEDOUCHE B.	Professeur/IPA	Promoteur
Mme HAMAIDI-CHERGUI F.	Professeur /USDB1	Co-promotrice

Année universitaire : 2023/2024

# Remerciement

*Nous exprimons notre gratitude envers Dieu Tout-Puissant pour nous avoir donné la détermination, l'endurance et la persistance nécessaires pour mener ce travail à bien.*

*Nous exprimons notre profonde gratitude à notre promoteur M. Bendeddouche Badis pour son accueil chaleureux, son accompagnement et ses orientations lors de la réalisation de notre mémoire de fin d'études au sein de son département. Nous remercions également notre chère Co-promotrice Mme Hamaidi Fella pour son encadrement, ses orientations précieuses et son soutien académique tout au long de notre projet. Leur aide, leur disponibilité et la confiance qu'ils nous ont accordée ont été essentiels à la réalisation de ce travail.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements à l'ensemble de membre de*

*Jury :*

*Nous remercions chaleureusement Mme Eddaikra d'avoir accepté de présider le jury de ce travail. Nous adressons également nos sincères remerciements à Mme Bokreta pour l'intérêt qu'elle a porté en acceptant d'examiner notre travail.*

*Nous sommes profondément reconnaissants envers Mme Ouahchia Celia et M. Boutekfa Yacine pour leurs conseils et orientations précieux lors de la correction de notre mémoire. Leurs remarques multiples ont grandement contribué à parfaire ce travail.*

*Nous tenons à exprimer notre sincère reconnaissance envers tout le personnel du Laboratoire de Bactériologie des Aliments, des Eaux et de l'Environnement de l'Institut Pasteur d'Algérie. Nous remercions tout particulièrement Mme Abdennour Sarah pour son précieux accompagnement lors de la partie pratique de notre mémoire, ainsi que M. Ayad Nassim pour son aide précieuse et ses orientations lors de notre étude statistique. Leur expertise et leur soutien ont été cruciaux pour obtenir des résultats précis et fiables dans notre travail.*

*Enfin, un immense merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Dédicace

C'est avec un immense plaisir que je dédie ce modeste travail, empreint d'un profond amour, à **ma très chère mère Lamia** ses encouragements, son amour indéfectible ont été précieux tout au long de la préparation de mon mémoire de fin d'études.

### À mon cher père Marouane,

Qui m'a soutenu tout au long de cette période de mémoire et de stage, ainsi que durant mes années universitaires.

### À mon grand-père,

Que j'aime de tout mon cœur, je suis reconnaissante pour son amour et son soutien constants tout au long de ma vie d'étudiante.

### À ma chère grand-mère

Pour ton soutien infaillible et ton amour sans limites, je dédie humblement ce travail. Merci pour tout.

À tous les membres de la famille **Tahar Djebbar** et **Turqui**, merci pour votre soutien.

### À ma chère tante Fella

Ton soutien pendant cette période difficile de mon mémoire a été précieux. Je t'en suis profondément reconnaissante et je dédie ce travail à toi.

À **mon frère Walid**, pour ton soutien constant et ta présence rassurante, je dédie ces mots avec reconnaissance.

À toute l'équipe de **l'Institut Pasteur** pour leur soutien moral et leur accueil chaleureux et aussi à **madame Nora** pour son aide précieuse.

### À Nadji Rayan

Pour ses encouragements constants et ses conseils avisés qui ont été une source d'inspiration et de soutien moral précieux tout au long de la rédaction de mon mémoire, je lui dédie ce travail avec une profonde gratitude. Merci pour ta présence et ton soutien inestimable.

**Enfin**, à ma très chère binôme et sœur d'amour, **Bounedjar Aya**, Ton soutien inconditionnel et notre collaboration tout au long de notre travail ont été bien plus qu'une simple expérience académique. Chaque étape que nous avons franchie ensemble a été illuminée par ta présence et ta bienveillance. Je te remercie du fond du cœur pour toutes les fois où tu m'as soutenue, encouragée et inspirée.

**Rayane**

## Dédicace

Je dédie ce travail avec une profonde reconnaissance et un amour sincère.

### À mon cher père Bilel

Pour ton amour inconditionnel, tes sacrifices pour mon éducation, et ton soutien constant qui m'ont enseigné la persévérance, je te dédie ce travail avec toute ma reconnaissance et mon amour sincère.

### À ma chère maman Mahdia

Pour tout ce que tu as fait pour mon bonheur et ma réussite, tes prières et ta tendresse infinie, je t'offre ce travail en signe de gratitude profonde et d'affection sincère.

À mes grands-parents paternels, qui m'ont apporté leur soutien précieux avant leur décès.

À mes grands-parents maternels, merci pour votre soutien et votre aide précieuse tout au long de mon parcours académique. Vos encouragements et vos conseils ont été une source de force et de motivation. Ce travail est également pour vous, en signe de ma profonde reconnaissance.

### À mes adorables frères, Hamza et Othman

Merci pour votre soutien indéfectible, votre encouragement et votre capacité à toujours me remonter le moral. Ce travail est dédié à chacun de vous, dans l'espoir que cela vous inspire à réaliser vos propres réussites.

À tous les membres de la famille **Bounedjar** et **Bouacha**, merci pour votre soutien.

À toute l'équipe de l'Institut Pasteur je souhaite exprimer ma gratitude pour leur assistance et leur accueil chaleureux.

À mon amie **Yousra**, ton soutien constant et ton amitié précieuse ont été une source d'inspiration. Ce travail est également dédié à toi, en signe de reconnaissance et de gratitude pour ta présence dans ma vie universitaire.

À ma sœur et binôme **Rayane**, Chaque étape de notre parcours académique, nous l'avons franchie main dans la main. Ta collaboration précieuse et ton soutien indéfectible ont été bien plus que des mots : ils ont été le socle inébranlable de notre succès, et cela n'a fait que renforcer notre lien fraternel. Je te dédie ce travail avec une gratitude profonde et une admiration sincère pour tout ce que tu as apporté. Merci du fond du cœur.

**Aya**

# Listes Des tableaux

---

## Listes Des tableaux

<b>Tableau I</b> : Classification taxonomique de légionnelles.....	5
<b>Tableau III</b> : Méthode de détection des légionelles dans les échantillons biologiques.....	9
<b>Tableau V</b> : Réservoirs de légionnelles selon différentes réglementations.....	11
<b>Tableau VI</b> : Techniques de recherche et d'identification des légionnelles dans les eaux chaudes.....	16
<b>Tableau VII</b> : Résultats de l'identification de trois souches appartenant à la famille des Legionellaceae.....	34
<b>Tableau XI</b> : Résultat d'antibiogramme en utilisant E test sur différent souche de légionnelles..	41
<b>Tableau II</b> : Différent espèces et sérogroupe de légionelles.....	69
<b>Tableau IV</b> : Différentes formes pathogène causées par les Légionnelle.....	71
<b>Tableau VIII</b> : Répartition des légionelles selon la région.....	89
<b>Tableau IX</b> : Répartition des légionelles selon l'origine du prélèvement .....	89
<b>Tableau X</b> : Analyse Descriptive de l'Impact de la Température sur la Présence et l'Absence de Légionelles.....	90

# Liste des figures

---

## Liste des Figure

<b>Figure 1:</b> Micrographie électronique de la croissance de <i>Legionella pneumophila</i> .....	6
<b>Figure 2:</b> Cycle biphasique de <i>Legionella pneumophila</i> .....	8
<b>Figure 3:</b> Modèle conceptuel pour l'exposition à Légionnelle par inhalation d'aérosols de douche contenant des légionnelles dérivés de la plomberie in situ des bâtiments .....	10
<b>Figure 4:</b> : Schéma de différents mécanismes de résistance antimicrobiens chez <i>legionella pneumophila</i> .....	13
<b>Figure 5:</b> Les origines variées des prélèvements de légionelles .....	19
<b>Figure 6:</b> Schéma illustrant les principales étapes du protocole expérimental réalisé .....	20
<b>Figure 7:</b> Deux souches de référence 387 2018 et ATCC 3315.....	21
<b>Figure 8:</b> Lame après coloration au bleu de méthylène.....	23
<b>Figure 9:</b> : Coloration de gram pour la souche ET24 de <i>Legionella pneumophila</i> .....	24
<b>Figure 10:</b> Test latex pour identification sérologique des légionelles .....	24
<b>Figure 11:</b> Appareil MALDI-TOF EXS2600 .....	25
<b>Figure 12:</b> Principe de la désorption -ionisation laser assistée par matrice .....	26
<b>Figure 13:</b> Réalisation de l'antibiogramme avec E test pour les souches sauvages des légionelles (souche 1 jusqu'as la souche 6 pour <i>L pneumophila</i> LP2-14 ; <i>L pneumophila</i> LP1 ; <i>Legionella spp</i> ; souche <i>L pneumophila</i> ATCC3315) en utilisant la Ciprofloxacine, Ampicilline et Amoxicilline +Acide clavulanique.....	27
<b>Figure 14:</b> Conservation de la souche <i>Legionella pneumophila</i> séro groupe 1 et séro groupe 2-14 dans GEN bag .....	27
<b>Figure 15:</b> Conservation des souches sauvages de <i>Legionella pneumophila</i> séro groupe 2-14 et 1 .....	28
<b>Figure 16:</b> Conservation de la souche <i>Legionella pneumophila</i> dans les cryotubes.....	29

## Liste des figures

---

<b>Figure 17:</b> Répartition des échantillons selon la présence /absence des légionelles .....	32
<b>Figure 18:</b> Aspect caractéristique des légionelles ( <i>Legionella pneumophila</i> ATCC3315) après isolement dans deux milieux de base différent. ....	33
<b>Figure 19:</b> Identification de l'espèce <i>Legionella pneumophila</i> sg2-14 sub espèces <i>fraseri</i> par MALDI-TOF EXS2600 .....	36
<b>Figure 20:</b> Répartition des espèces de légionelles .....	37
<b>Figure 21:</b> Répartition des légionelles selon la région .....	38
<b>Figure 22:</b> Répartition des légionelles selon l'origine du prélèvement.....	39
<b>Figure 23:</b> Répartitions des légionelles selon la température .....	40

# Liste d'abréviation

---

## Liste d'abréviation

**ACES** : acide N2-acétamido-2-amino-éthane-sulfonique

**BCYE**: Buffered Charcoal Yeast Extract

**BHIB**: Brain Heart Infusion Broth

**BYE**: Buffered Yeast Extract

**CIF** : types distributeurs automatiques de chlore en ligne

**CLSI**: Clinical and Laboratory Standards Institute

**CR1/CR3**: Complement Receptor 1/3

**DOT/ICM**: **DOT**: Defective Organelle Trafficking;/ **ICM**: Intra-Cellular Multiplication

**Fla A**: Flagelline A

**GVPC**: Glycine, Vancomycine, Polymyxine B et Cycloheximide

**lag 1**: Legionella lipopolysaccharide-associated gene

**LCL**: Lipopolysaccharide Cell Loosening

**LCV**: Legionella Containing Vacuole

**LLAP**: Legionella Latex Agglutination Test

**Lp**: *Legionella pneumophila*

**MALDI-TOF**: **MALDI**: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice) / **TOF**: Time-Of-Flight (Temps de Vol).

**MIFs**: Mature Infectious Forms

**MIP**: Macrophage Infectivity Potentiator

**MOMP** : Major Outer Membrane Protein

**OMPs** : Outer Membrane Proteins

**PiLEL** : **pi** : pilus/ **L** : *Legionella* / **EL** : Une désignation spécifique souvent utilisée pour différencier différents types de gènes de pilus chez *Legionella*

**PPIase** : Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase

**QRD** : Quinolone Resistance Determining Region

**RtxA** : Le gène qui code pour la protéine RTX (Repeats in ToXin) chez *Legionella*

**sdeA/laLA**: side family effector A / **laLA**: Legionella's effector for autophagy and lysosome avoidance

**TAR** : Tour Aéroréfrigérante

**TSA** : Trypticase Soy Agar

## Résumé

La gestion appropriée de l'eau est cruciale pour prévenir la prolifération de *Legionella pneumophila*, responsable de la légionellose, une infection respiratoire sérieuse. Le développement de cette bactérie dépend de facteurs tels que la température et la présence d'autres bactéries. Cette étude vise à rechercher la présence de *L. pneumophila* dans les établissements hôteliers et hospitaliers, en effectuant des prélèvements d'eau dans des sites potentiels de prolifération comme les eaux chaudes sanitaires des chambres, des piscines, des douches et robinets. Les résultats permettront de mieux comprendre la distribution de cette bactérie et de souligner l'importance de réglementations pour prévenir ce risque sanitaire.

Au total 63 prélèvements ont été analysés. Dans 8 échantillons, nous avons isolé 6 *Legionella pneumophila* 2-14 (une souche *Legionella pneumophila* séro groupe 2-14 sub espèce *fraseri* identifiée par l'appareil MALDI-TOF EXS2600) puis 1 *Legionella pneumophila* 1 et 1 *Legionella spp.*

Les résultats obtenus ont révélé que la région et l'origine du prélèvement, ainsi que la température, ont un impact sur la qualité des eaux chaudes dans les établissements résidentiels en Algérie. Nous avons trouvé une concentration notable de légionelles par rapport aux origines dans les mélangeurs de types distributeurs automatiques de chlore en ligne, avec un échantillon représentatif (7,93%, n=5), et une prévalence élevée des légionelles dans la région de Constantine (7,27%, n=4). Nos résultats révèlent aussi que *Legionella* peut croître dans un intervalle de température allant de 41,21 °C à 53,28 °C.

La température a présenté l'impact le plus important sur la présence et absence des légionelles trouvées dans les établissements résidentiels avec une p-value = 0,01.

L'association antibiotique Amoxicilline + acide clavulanique a présenté une meilleure efficacité dans l'inhibition des souches environnementales de *Legionella*.

**Mots clés :** établissements résidentiels, *Legionella pneumophila*, eaux chaudes, légionellose, profil de résistance, température

## ABSTRACT

The proper management of water is crucial to prevent the proliferation of *Legionella pneumophila*, which causes Legionnaires' disease, a serious respiratory infection. This study aims to investigate the presence of *L. pneumophila* in hotel and hospital facilities by sampling water from potential proliferation sites such as hot water systems in rooms, pools, showers, and taps. The results will help better understand the distribution of this bacterium and emphasize the importance of regulations to prevent this health risk.

A total of 63 samples were analyzed. In 8 samples, we isolated 6 *Legionella pneumophila* 2-14 (one strain of *Legionella pneumophila* serogroup 2-14 subsp. *fraseri* identified by the MALDI-TOF EXS2600 device), 1 *Legionella pneumophila* 1, and 1 *Legionella spp.*

The results revealed that the region and the origin of the sample, as well as the temperature, have an impact on the quality of hot water in residential establishments in Algeria. We found a notable concentration of *Legionella* in samples from In-line automatic chlorine dispensers, with a representative sample (7.93%, n=5), and a high prevalence of *Legionella* in the Constantine region (7.27%, n=4). Our results also reveal that *Legionella* can grow in a temperature range from 41.21°C to 53.28°C.

Temperature had the most significant impact on the presence and absence of *Legionella* found in residential establishments with a p-value = 0.01.

The antibiotic combination of Amoxicillin + Clavulanic acid showed superior effectiveness in inhibiting environmental strains of *Legionella*.

**Keywords:** residential facilities, *Legionella pneumophila*, hot water, Legionellosis, resistance profile, temperature

## ملخص

إدارة المياه بشكل مناسب أمر حيوي لمنع انتشار الليجيونيلا الرئوية، وهي البكتيريا المسؤولة عن مرض الليجيونيلا، وهو عدوى تنفسية خطيرة. يعتمد تطور هذه البكتيريا على عوامل مثل درجة الحرارة ووجود بكتيريا أخرى. تهدف هذه الدراسة إلى البحث عن وجود الليجيونيلا في المنشآت الفندقية والمستشفيات، من خلال أخذ عينات من المياه في المواقع المحتملة للانتشار مثل مياه الدش، المسابح، والحفريات. ستساعد النتائج في فهم أفضل لتوزيع هذه البكتيريا وتسلط الضوء على أهمية التشريعات لمنع هذا الخطر الصحي.

تم تحليل 63 عينة في المجموع. في 8 عينات، عزلنا 6 عينات من الليجيونيلا الرئوية 2-14 (سلالة الليجيونيلا الرئوية الفئة السيرولوجية 2-14 تحت نوع فرايري تم تحديدها بواسطة جهاز مطياف الكتلة باستخدام الاستشراب الزمني بمساعدة ماتريكس الليزر)، ثم 1 الليجيونيلا الرئوية 1 و 1 الليجيونيلا spp.

أظهرت النتائج أن المنطقة ومصدر العينة ودرجة الحرارة لها تأثير على جودة المياه الساخنة في المؤسسات السكنية في الجزائر. تم العثور على تركيز ملحوظ من الليجيونيلا فيما يتعلق بالمصادر في موزعات الكلور التلقائية في الخط، مع عينة تمثيلية (7.93%، n=5)، وانتشار عالٍ لليجيونيلا في منطقة قسنطينة (7.27%، n=4). كما تبين أن الليجيونيلا يمكن أن تنمو في نطاق درجة حرارة يتراوح بين 41.21 درجة مئوية إلى 53.28 درجة مئوية

درجة الحرارة أظهرت تأثيراً كبيراً على وجود الليجيونيلا في المؤسسات السكنية، مع قيمة p تساوي 0.01.

كانت مزيج الأدوية الحيوية أموكسيسيلين + حمض الكلافولانيك أكثر فعالية في تثبيط السلالات البيئية من الليجيونيلا.

### الكلمات المفتاحية:

المؤسسات السكنية، الليجيونيلا الرئوية، المياه الساخنة، داء الفيالقة، نمط المقاومة، درجة الحرارة

## Table des Matières

Remerciements	
Dédicace	
Dédicace	
Listes des tableaux	
Liste des Figures	
Liste des abréviations	
Résumé	
ABSTRACT	
ملخص	
Table des Matières	
INTRODUCTION.....	1
<b>Partie Bibliographique</b>	
I. GENERALITES SUR LES LEGIONNELLES.....	4
I.1. Agent pathogène : <i>Legionella spp</i> .....	4
I.2. Taxonomie : .....	4
I.3. Morphologie .....	5
I. 4 Facteurs de virulence associés à la pathogénicité et à la prolifération des souches de <i>Legionella</i> .....	6
I.5. Cycle de vie .....	7
I.6. Diagnostic biologique.....	8
I.7. Risque sanitaire .....	9
I.8. Epidémiologie et surveillance de légionnelles dans les eaux chaudes .....	11
II. EVALUATION DE LA RESISTANCE DES SOUCHES DE <i>Legionella pneumophila</i> AUX ANTIBIOTIQUES ET METHODES DE DETECTION.....	12
II.1. Méthodes de détection de la sensibilité aux antibiotiques de <i>Legionella pneumophila</i> .....	13
III. TECHNIQUES DE RECHERCHE.....	15

III.1. Milieux de culture :.....	15
III.2. Méthode de détection.....	15

### **Partie expérimental**

I. MATERIEL ET METHODES .....	18
I.1. Matériel.....	18
I.2. Méthodes .....	18
I.2.1. Mode de prélèvements .....	18
I.2.2. Isolement et recherches de légionelle dans les eaux chaudes .....	21
I.2.2.1. Etude comparative pour la sélection de la base utilisée pour la préparation des milieux de culture GVPC et BCYE :.....	21
I.2.2.2. Lecture et confirmation :.....	22
I.2.2.3. Dénombrement des colonies suspecte de légionelles : .....	22
I.2.3. Identification microscopique.....	23
I.2.3.1. Observation à l'état frais .....	23
I.2.4. Identification biochimique .....	24
I.2.4.1. Test d'agglutination sérologique pour identification de légionelle .....	24
I.2.5. Identification taxonomique par MALDI-TOF EXS2600.....	24
I.2.6. Antibiorésistance des légionelles dans les eaux chaudes .....	26
I.3. Conservation des souches.....	27
I.3.1. Conservation dans la chambre froide :.....	27
I.3.2. Conservation dans les tubes de conservation :.....	28
I.3.3. Conservation des souches dans les cryotubes .....	28
I.4. Analyse des données.....	29

### **RESULTATS ET DISCUSSION**

II.RESULTATS ET DISCUSSION .....	31
II.1. Répartition des échantillons selon la présence /absence des légionelles .....	32
II.2. Résultats comparatifs pour la sélection de la base utilisée pour la préparation des milieux de culture GVPC et BCYE.....	33

II.3. Résultats de l'identification.....	34
II.4. Résultats de l'identification taxonomique par MALDI-TOF.....	35
II.5. Répartition des espèces de légionelles .....	36
II.6. Évaluation de la relation entre la prévalence de <i>Legionella</i> et la région .....	37
II.7. Evaluation de la relation entre la prévalence de <i>Legionella</i> et l'origine du prélèvement .....	39
II.8. Evaluation de la relation entre la présence de <i>Legionella</i> et la température de l'eau lors du prélèvement .....	40
II.9. Résultat de l'antibiogramme .....	41
CONCLUSION .....	44
Référence bibliographique .....	47
Annexe .....	55

***Introduction***

***Générale***

## INTRODUCTION

Selon **Bartram et al., (2007)**, les eaux, qu'elles soient naturelles ou artificielles, sont le foyer de nombreuses bactéries à travers le monde. À partir du 20<sup>ème</sup> siècle, nous avons constaté une augmentation des infections bactériennes, notamment celles causées par la bactérie *Legionella pneumophila*.

Les légionnelles, des bactéries à Gram négatif comme décrit par **Cabanes et al** en 1995, sont désormais identifiées comme des agents pathogènes émergents, pouvant causer des affections respiratoires potentiellement mortelles. Parmi celles-ci, la légionellose présente une variété de gravité allant d'une fièvre légère, connue sous le nom de fièvre de Pontiac, à une forme sévère et souvent mortelle, appelée maladie du légionnaire (**Bartram et al., 2007**).

Cette bactérie, présente dans l'environnement, a la capacité de se développer à des températures allant de 35 °C à 40 °C, tandis que sa multiplication se ralentit aux alentours de 45 °C (**Cabanes et al., 1995**).

L'être humain se contamine principalement par l'inhalation d'aérosols provenant des réseaux de distribution d'eau des établissements recevant du public (**Seck et al., 2016**).

Ainsi, selon l'**arrêté du 1er février 2010** relatif à la surveillance des légionnelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire ce qui rend primordiale la surveillance annuelle des légionnelles et de la température de l'eau chaude sanitaire dans les réseaux collectifs telle que les établissements hôteliers et hospitaliers.

Ces bactéries ont la capacité de se multiplier dans les macrophages alvéolaires et dans les cellules épithéliales pulmonaires induisant ainsi la légionellose. L'environnement hydrique constitue le réservoir majeur de ces bactéries qui affectionnent particulièrement les eaux tièdes et colonisent, à la faveur de conditions favorables, les biofilms des réseaux d'eau chaude sanitaire qui permettent, entre autres, sa dissémination dans l'air. *Legionella pneumophila* séro groupe 1, pathogène responsable de plus de 80% des cas confirmés de légionellose en laboratoire (**Palusinska-szys et al., 2019**).

Ainsi l'antibiorésistance de la souche environnementale *Legionella pneumophila* revêt une importance capitale dans la prévention et la gestion des risques sanitaires associés à cette bactérie. Bien que les cas de résistance acquise soient rares, des échecs thérapeutiques ont été observés même après un usage adéquat des macrolides et/ou des fluoroquinolones (**Natås et al., 2019**). De rares études, telles que celle de **Cocuzza et al en 2021**, se concentrent sur le profil de résistance des légionnelles, principalement en raison des difficultés liées à leur isolement et du manque de méthodes, comme souligné par **Natås et al en 2019**.

# Introduction Générale

---

Dans cette étude, nous avons collecté dans la première partie de ce mémoire des légionelles originaires de plusieurs régions de l'Algérie pour déterminer l'impact des différents milieux de culture et des facteurs environnementaux comme la température sur la multiplication et le comportement de *Legionella pneumophila*.

L'objectif principal de notre étude est de :

- Procéder à l'isolement et à l'identification des diverses espèces de légionelles présentes dans les systèmes d'eau chaude, conformément à la norme ISO 11731/2017.
- Évaluer la prévalence des souches pathogènes de légionelles dans les eaux chaudes en Algérie.
- Déterminer la sensibilité des souches environnementales de légionelles à différents antibiotiques.
- Étudier l'impact de la température sur la présence des légionelles.

***REVUE***

***BIBLIOGRAPHIQUE***

## I. GENERALITES SUR LES LEGIONNELLES

### I.1. Agent pathogène : *Legionella spp*

Il y a plus de 50 ans, la bactérie a été identifiée pour la première fois dans le sang d'un soldat, mais elle n'était pas considérée comme un pathogène important à ce moment-là. Cependant, son importance a été mise en évidence en 1976 lorsqu'une épidémie mystérieuse de pneumonie a touché les membres de l'American Legion en Pennsylvanie, d'où son nom, *Legionella* (Winn, 1966).

C'est une bactérie mésophile ubiquitaire de l'environnement surtout retrouvée dans les réseaux sanitaires (Fields et al., 2002). Leur croissance optimale dépend de divers facteurs, notamment le pH, la température entre 25°C à 45°C, l'hôte (comme les amibes ou les cellules de mammifères), la présence de CO<sub>2</sub>, les acides aminés, la disponibilité en eau et la présence d'autres microorganismes comme *Methylobacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (Okunaga et al., 2022 ; Fields et al., 2002).

Les Légionnelles ont montré leur capacité de persister en tant que parasites intracellulaires au sein de protozoaires, notamment les amibes libres. Cette caractéristique a été mise en évidence en 1980, lorsque l'on a découvert que *Legionella pneumophila* se multiplie à l'intérieur de certaines amibes, telles que *Acanthamoeba castellanii* (retrouvée sous forme kystique dans les eaux thermales selon les recherches du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations de l'Institut Pasteur) et *Naegleria lovaniensis*. (Philippe et al., 2006).

### I.2. Taxonomie :

Actuellement, on recense plus de 50 espèces de légionelles, un nombre qui continue d'augmenter. À quelques exceptions près, la plupart des espèces de légionelles isolées cliniquement se retrouvent également dans l'environnement. Par exemple, deux espèces, *Legionella hackeliae* et *Legionella tusconensis*, sont rarement observées dans l'environnement. Certaines espèces présentent une diversité de sérogroupes. *Legionella pneumophila*, par exemple, comprend 15 sérogroupes. De plus, trois sous-espèces de *Legionella pneumophila* ont été identifiées, chacune pouvant inclure différentes souches provenant de différents sérogroupes (Bartram et al., 2007).

- Sérogroupes 1 à 14 pour *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*
- Sérogroupes 1, 3, 4 et 5 pour *L. pneumophila* subsp. *fraseri*

- Séro groupe 5 uniquement pour *L. pneumophila* subsp. *pascullei*

Certaines légionnelles, telle que *Legionella lytica*, sont impossibles à cultiver sur des milieux synthétiques car elles nécessitent des facteurs de croissance qui restent encore inconnus. On les qualifie alors de pathogènes amibiens "Legionella-like" (LLAP), et leur isolement ne peut être réalisé qu'en utilisant des amibes en co-culture (**Bartram et al.,2007**).

Le tableau I et (**tableau II, Voir annexe I**) de la deuxième édition du manuel de Bergy (**2004**) présente la classification suivante :

**Tableau I:** Classification taxonomique de légionnelles.

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Legionellales</i>
Famille	<i>Legionellaceae</i>
Genre	<i>Legionella</i>
Espèces	<i>Legionella pneumophila</i> <i>Legionella spp</i>

### I.3.Morphologie

*Legionella spp* est un bacille Gram négatif aérobie, chimio-organotrophe qui utilise des acides aminés (arginine, acide L-glutamique-cystéine) comme source d'énergie et de carbone. Cette bactérie ne présente pas de spores, n'est pas acido-résistantes et oxydase négative (à l'exception de *L. anisa*). Catalase-positif (à l'exception de *L. worsleiensis*) ne sont pas capsulées. Sa taille varie de 0,3 à 0,9 µm de large sur 2 à 20 µm de long. Les légionnelles possèdent un ou plusieurs flagelles (parfois une paire) qui peuvent atteindre 8 µm de long et d'environ 14 à 25 nm de diamètre, à l'exception de trois espèces qui ne possèdent pas de motilité (*L. oakridgensis*, *L. natarum* et *L. londiniensis*). Les pili sont répartis sur toute la surface bactérienne. Au niveau macroscopique, elles présentent un aspect distinctif caractérisé par un

centre nombril entouré de bordures en verre fritté. Ces colonies apparaissent comme de petites masses grises avec un nombril au centre. De plus, elles requièrent du fer III et de la L-cystéine pour leur croissance (Assaidi, 2020 ; Thomas, 2004) (Figure 1).



**Figure 1:** Micrographie électronique de la croissance de *Legionella pneumophila* (x90,000) (Brenner et al.,2007).

## I. 4 Facteurs de virulence associés à la pathogénicité et à la prolifération des souches de *Legionella*

D'après Chauhan et Shames, (2021) et Manske et Hilbi, (2014) la virulence de *Legionella pneumophila* est étroitement liée à son métabolisme. Elle se manifeste rapidement en induisant une réorganisation moléculaire des phagosomes contenant les légionnelles. Ce processus est crucial pour la formation de la « *Legionella* Containing Vacuole » (LCV), nécessitant un ensemble de facteurs comprenant le facteur de surface bactérienne et le facteur de sécrétion.

- **Les lipopolysaccharides (LPS) :** Un élément immunogène de surface important produit par *Legionella pneumophila* active les voies classiques et alternatives du complément (Petzold et al., 2013). L'hydrophobicité du LPS, causée par le gène lag-1, peut expliquer sa survie accrue dans les aérosols et son adhésion accrue aux amibes et aux surfaces inertes (Palusinska-Szys et al., 2019).
- **Structure de surface :** La « Major Outer Membrane Protein » (MOMP), encodée par le gène Omps, la porine, le « Lipopolysaccharide Cell Loosening » (LCL) et une protéine présentant des similitudes avec le collagène interviennent dans le processus d'adhérence aux macrophages, en se liant aux récepteurs CR1 et CR3. D'après Chauhan et Shames, (2021) et Steinert et al., (2002), « Major Outer Membrane Protein »

(MOMP) se lie aux récepteurs de compléments CR1 et CR3. Présents sur la surface des monocytes humains (macrophages) et favorise l'adhérence de la bactérie à la cellule hôte.

- **Pili type 1** : Avec une taille qui varie entre 0,8 et 1,5  $\mu\text{m}$  et codée par le gène *piLEL*, cette protéine joue un rôle crucial dans la virulence. Cela se manifeste par la capacité de *Legionella pneumophila* à effectuer une transformation de l'ADN (Stone et Kwaik, 1999). Elle garantit la fixation initiale des cellules hôtes et assure également la mobilité par twitching et la formation de biofilm.

Le pilus de type 1 est également présent, codé par le gène *rtxA*, qui est seulement impliqué dans l'adhérence aux surfaces (Chauhan et Shames, 2021).

- **Protéine de choc thermique(hsp60)** : Selon Garduño et al., (1988), elle joue un rôle dans l'adhérence aux cellules eucaryotes (macrophages), elle est produite par *Legionella pneumophila* lors de sa multiplication intracellulaire et occupe une place prépondérante dans la membrane de la bactérie.
- **Les flagelles** : Ont un rôle essentiel dans l'infection en favorisant l'adhérence à la surface de la cellule hôte, car leur présence a un effet bénéfique sur la phase initiale de l'infection des cellules hôtes. Elles sont principalement constituées de la protéine Fla A (Appelt et Heuner, 2017).
- **Le système de sécrétion de type 4b (t4ss)** : Le système « Defective Organelle Trafficking/ Intra-Cellular Multiplication » (Dot/Icm) hautement conservé, joue un rôle crucial dans de nombreux processus, notamment la réplication intracellulaire de *Legionella pneumophila* en facilitant la translocation de protéines effectrices. Cette translocation permet d'éviter la dégradation des bactéries par les lysosomes. Parmi les effecteurs transloqués, l'effecteur SdeA/LaLA joue un rôle essentiel dans l'absorption des légionnelles par phagocytose. (Chauhan et Shames, 2021).
- **Protéine Macrophage Infectivity Potentiator (Mip)** c'est une protéine qui favorise la réplication intracellulaire de *Legionella pneumophila* dans la cellule hôte (Ludwig et al., 1994). Particulièrement durant la première phase de l'infection, elle utilise les repliements des protéines contenant les prolines grâce à l'enzyme « Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase » (PPIase) permettant la réplication de ce pathogène (Cianciotto, 2001).

## I.5. Cycle de vie

Le cycle de vie de légionnelle alterne entre deux phases : (Figure 2).

- Phase de réplication (réplication exponentielle dans des conditions riches en nutriments) et phase de transmission (phase stationnaire en cas de pénurie de nutriments).
- Une phagocytose enroulée ou conventionnelle se produira en fonction de l'hôte naturel (protozoaire) ou macrophage (hôte accidentel).
- La bactérie pénètre (l'invasion) et formée des « *Legionella* Containing Vacuole » (LCV) pour se multiplier à l'intérieur des cellules.
- Le phagosome se lie à « Reticulum endoplasmique » (RE) pour créer des compartiments réplicatifs, tandis que des modifications morphologiques se produiraient en réponse à la pénurie de nutriments des formes de « Mature Infectious Forms » (MIFs) se distinguent et acquièrent un phénotype de virulence.
- Les « Mature Infectious Forms » (MIFs) sont libérés une fois que les conditions environnementales sont appropriées pour favoriser la survie des légionelles, comme un pH de 6.9, une température de 25-45°C et la présence de certaines bactéries, comme *Pseudomonas aeruginosa*, qui est utilisée comme source de nutriment par *Legionella pneumophila* (Chauhan et Shames, 2021 ; Faulkner et Garduño, 2002).

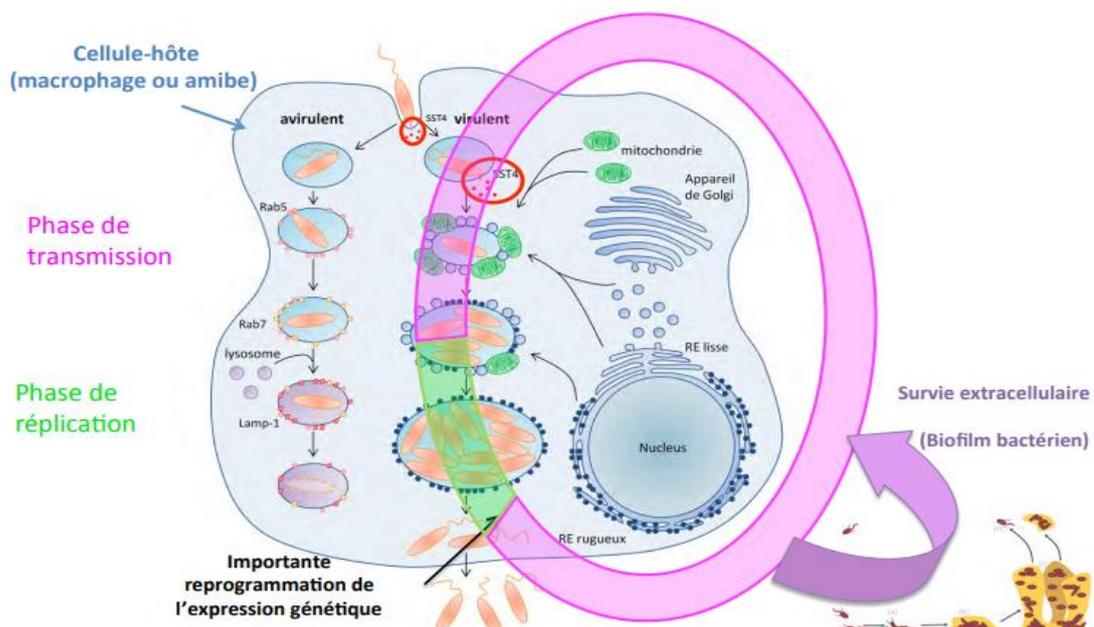


Figure 2: Cycle biphasique de *Legionella pneumophila* (Anne Vianney, 2015)

## I.6 Diagnostic biologique

Le système respiratoire humain est affecté par les maladies causées par *Legionella pneumophila*, ce qui rend la LP difficile à différencier des pneumonies causées par d'autres

agents pathogènes, tels que les mycoplasmes et le coronavirus (SARS-COV-2). Il est recommandé le recours aux méthodes biologiques afin d'assurer une détection efficace (**Bai et al., 2023**) (**tableau III**).

**Tableau III:** Méthode de détection des légionelles dans les échantillons biologiques

Méthode	Echantillon	Avantage	Inconvénients
Culture (sur BCYE) ou bien hémoculture (rendement faible)	Expectoration Échantillon issu après bronchoscopie	Dénombrement aisé Bon rendement	Technique qui prend du temps
Direct Fluorescent Antibody (DFA) (coloration par anticorps fluorescents direct)	Expectoration Échantillon de tissus Lavage broncho-alvéolaire (LBA)	Résultat rapide	Technique exige un personnel expérimenté Possibilité d'obtention d'un faux positif lors d'une réaction croisée avec d'autres bactéries DFA n'est pas suffisante pour le diagnostic de l'infection à légionnelle
Détection d'antigène urinaire	Urine	Test rapide et facile à le réaliser	Incapacité de détecter de manière fiable des organismes autres que <i>L.pneumophila</i> séro groupe 1
PCR	Liquide biologique	Sensibilité supérieure à celle indiquée par la culture Meilleure précision	Méthode qui nécessite une personne expérimentée pour extraction d'ADN

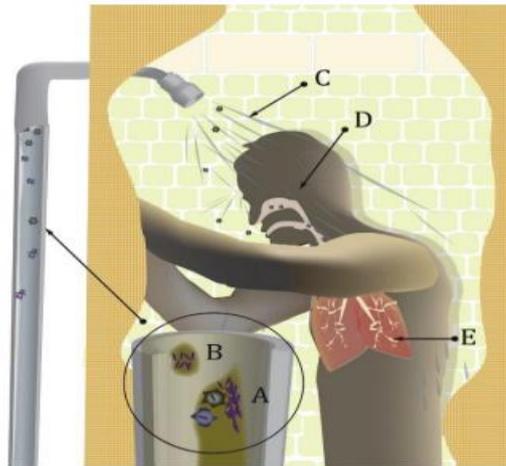
(**Bai et al., 2023**).

## I.7.Risque sanitaire

Chez l'être humain, l'agent pathogène responsable de la maladie se propage généralement sous forme de petites gouttelettes d'eau et d'aérosols contaminés. Pour être pathogène, ces particules doivent avoir un diamètre inférieur à 5 µm afin de pouvoir atteindre les alvéoles pulmonaires (**Harper et Morton, 1953**).

La découverte de l'incapacité de *Legionella pneumophila* à infecter les cellules épithéliales alvéolaires a été faite en 1993. L'homéostasie entre l'environnement et les alvéoles est maintenue grâce à l'action des macrophages alvéolaires, qui servent de niche de réplication pour diverses maladies (Harper et Morton, 1953).

Il y a d'autres facteurs qui favorisent la contamination par cette bactérie hydrotellurique, tels que le genre (principalement les hommes), l'âge (plus de 50 ans), le tabagisme, l'alcoolisme et le diabète (Cattan et al., 2019). La figure suivante représente le modèle conceptuel : (figure 3)



**Figure 3:** Modèle conceptuel pour l'exposition à Légionnelle par inhalation d'aérosols de douche contenant des légionnelles dérivés de la plomberie in situ des bâtiments (Schoen et Ashbolt, 2011).

Tout d'abord, *Legionella* se multiplie dans le biofilm de plomberie, potentiellement en colonisant le biofilm ou dans un hôte protozoaire (A). La Légionnelle, associée au biofilm se détache lors d'une douche (B), est transportée à la pomme de douche et est en aérosol (C). Enfin, Légionnelle aérosol est inhalée (D) et une fraction de cette dose inhalée est déposée dans la région alvéolaire des poumons (E).

Le diagnostic de la légionellose est souvent complexe. Cette pneumonie bactérienne est souvent confondue avec d'autres types de pneumonie (Viasus et al., 2022). On distingue trois formes:

- **Forme classique** : la maladie des légionnaires
- **Forme fébrile d'évaluation bénigne** : fièvre de Pontiac
- **Forme rare** : la forme extra pulmonaire

Pour expliquer chaque manifestation clinique (**Bush et Vazquez-Pertejo, 2024 ; Bouvet, 2006**) le **tableau IV voir annexe I** résume chaque forme clinique de légionellose.

## I.8.Epidémiologie et surveillance de légionnelles dans les eaux chaudes

La croissance de légionnelles nécessite un environnement humide, ce qui est principalement observé dans les différents réservoirs d'eau (**Tableau V**).

**Tableau V : Réservoirs de légionnelles selon différentes réglementations**

Réservoir	Niveau d'action (UFC/mL)	Mesures de gestion	Références
Réseau d'eau chaude	> 10 <sup>3</sup> <i>Legionella pneumophila</i>	- Niveau d'alerte : renforcer les mesures d'entretien, renforcer les contrôles et le cas échéant vérifier l'origine des écarts par rapport aux résultats d'analyses antérieures.	CSHPPF, guide « Gestion du risque lié aux légionnelles » publié en 2002(ministère de la santé et de la prévention française)
Etablissement de santé	> 10 <sup>3</sup> <i>Legionella pneumophila</i>	- Eviter la stagnation et assurer une bonne circulation de l'eau. - Lutter contre l'entartrage et la corrosion. - Maintenir l'eau à une température élevée dans les installations et mitiger l'eau au plus près des points d'usage.	Circulaire du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionnelles dans les établissements de santé (ministère de la santé et de la prévention française)
Etablissement thermal	Présence	La gestion dépend de l'étendue de la contamination et de la nature du point contaminé (émergence ou point d'usage). Les mesures de gestion peuvent aller jusqu'à la suspension des soins (du point d'usage contaminé jusqu'à la totalité de l'établissement).	Circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux (ministère de la santé et de la prévention française)

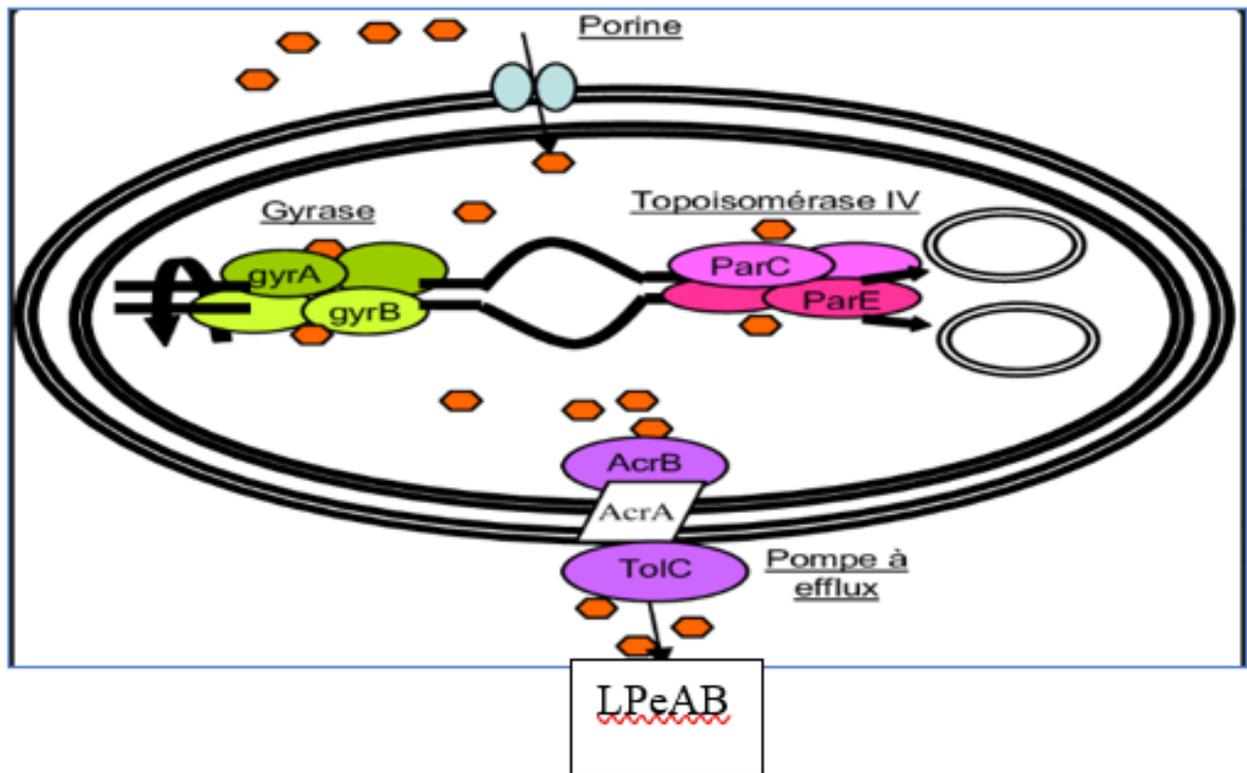
TAR	> 10 <sup>3</sup> <i>Legionella spp</i>	Mise en œuvre de mesures nécessaires pour atteindre des concentrations ≤ 10 <sup>3</sup> UFC/mL de <i>Legionella spp</i> .	Circulaire du 08/12/05 relative à l'application des arrêtés ministériels du 13 décembre 2004 relatifs aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air (ministère de la santé et de la prévention française)
	> 10 <sup>5</sup> <i>Legionella spp</i>	Arrêt de fonctionnement du système de refroidissement. - Vidange, nettoyage, désinfection avant remise en service.	Circulaire du 08/12/05 relative à l'application des arrêtés ministériels du 13 décembre 2004 relatifs aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air (rubrique 2921) (Ministère de la santé et de la prévention française)

## II. EVALUATION DE LA RESISTANCE DES SOUCHES DE *Legionella pneumophila* AUX ANTIBIOTIQUES ET METHODES DE DETECTION

L'érythromycine a été le premier antibiotique prescrit dans le traitement de la légionellose. Actuellement, les antibiotiques les plus fréquemment utilisés sont les macrolides et les fluoroquinolones en raison de leur efficacité démontrée in vitro (**Pedro-Botet et Yu, 2009**).

La résistance de *Legionella pneumophila* aux fluoroquinolones est principalement causée par des mutations dans le gène *gyrA*, notamment celles qui affectent la région QRD. Les altérations génétiques qui affectent les gènes *gyrA* et *parC*, qui sont responsables de la codification des sous-unités de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV, jouent un rôle essentiel dans la résistance chromosomique aux fluoroquinolones (**Shadoud, 2014**).

Chez *Legionella pneumophila*, la résistance aux macrolides est en partie influencée par la pompe à efflux LPeAB. Des mutations dans la région en amont de l'opéron LPeAB ont été identifiées comme des éléments associés à cette résistance. Ces mutations impactent les lignées résistantes, entraînant une surexpression de la pompe à efflux, ce qui renforce la capacité de la bactérie à éliminer activement les macrolides et contribue à son insensibilité à ces antibiotiques (Massip et al., 2017) (Figure 4).



**Figure 4 :** Schéma de différents mécanismes de résistance antimicrobiens chez *legionella pneumophila* (Ferran, 2009)

### II.1. Méthodes de détection de la sensibilité aux antibiotiques de *Legionella pneumophila*

L'évaluation de l'activité antibiotique contre les légionnelles se fait souvent par des méthodes extracellulaires pour déterminer leur CMI dans les eaux chaudes. Le traitement des infections à *Legionella pneumophila* est généralement empirique, en raison du manque de routine dans les tests d'antibiogramme et de la difficulté à isoler ces bactéries dans les échantillons cliniques. Contrairement à d'autres pathogènes, il n'existe pas de directives standardisées pour évaluer la sensibilité aux antibiotiques de *Legionella pneumophila*, ce qui rend difficile la distinction entre les souches sauvages et celles résistantes (Cocuzza et al., 2021).

La réalisation d'un antibiogramme pour les légionnelles en absence de norme spécifique impose différents paramètres (**Descours, 2013**) :

- Type de techniques
- Milieu de culture
- Inoculum bactérien
- La durée, la température et atmosphère d'incubation

Pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques des souches environnementales des légionnelles, il existe deux méthodes :

✚ **Diffusion en milieu solide (BCYE) en utilisant des bandelettes imprégnées d'antibiotique (Etest®)** où la CMI correspond à la plus petite concentration d'antibiotique pour laquelle les colonies bactériennes ne peuvent confluer autour de la bandelette. Cette dernière est sujette à réflexion au sein de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (**EUCAST**) (**Descours, 2013 ; Cocuzza et al., 2021**).

Selon **Descours, (2013)** pour évaluer la CMI des légionnelles, il est primordial de sélectionner le milieu de culture adéquat, en raison de l'exigence de L-cystéine et du pH =6.9, afin qu'elles puissent se développer dans des conditions favorables.

Les quinolones, l'érythromycine et la rifampicine se lient rapidement au charbon, ce qui entraîne une concentration libre dans le milieu inférieure à 8 % de la concentration totale d'antibiotique (**Descours, 2013 ; Cocuzza et al., 2021**). L'utilisation du BCYE implique le calcul des CMI corrigées à partir des CMI initiales obtenues sur ce milieu. Les CMI corrigées sont plus proches des valeurs observées dans des milieux sans charbon (**Descours, 2013 ; Cocuzza et al., 2021**).

Selon **Descours, (2013)**, l'utilisation du BCYE est recommandée pour la production d'antibiotiques. Cependant, la présence de charbon induit une surestimation des valeurs de CMI. Ainsi, pour obtenir des valeurs précises de la CMI, il est essentiel d'utiliser des concentrations plus élevées d'antibiotique et de procéder à des dilutions appropriées.

**La dilution de l'antibiotique de deux en deux en milieu liquide, ou la « micro dilution »**, est utilisée sur des milieux BYE alpha ou BCYE, où la CMI correspond à la concentration minimale d'antibiotique présente dans le puits, ce qui entraîne l'absence de croissance bactérienne visible à l'œil nu. Le meilleur rendement est obtenu avec la méthode de

micro dilution en milieu bovin sans charbon (BMD), ce qui garantit une performance optimale sans aucun inconvénient. (Descours, 2013 ; Cocuzza *et al.*, 2021).

## III. TECHNIQUES DE RECHERCHE

La détection des Légionnelles dans l'eau chaude nécessite des techniques et des milieux de culture spécifiques, avec des protocoles stricts à suivre pour une quantification précise et un isolement efficace. La complexité réside dans le respect de ces normes et dans l'utilisation de milieux favorisant la croissance et l'identification précise des bactéries.

### III.1. Milieux de culture :

Selon la norme ISO 11731/2017, il existe plusieurs milieux pour isoler les légionnelles :

- Gélose tamponnée au charbon actif et à l'extrait de levure (BCYE) (**annexe I**).
- Milieu de culture sélectif (BCYE+AB) (**annexe I**).
- Milieu de culture fortement sélectif : gélose à base de glycine, vancomycine, polymyxine B et cycloheximide (GVPC) (**annexe I**).
- Milieu de culture fortement sélectif : gélose de Wadowsky et Yee modifiée (MWY) (**annexe I**).
- Gélose au sang (**annexe I**).
- Gélose TSA (**annexe I**).

### III.2. Méthode de détection

La norme ISO 11731/2017 établit des procédures pour détecter et mesurer les légionnelles dans les eaux, soulignant l'importance de protocoles standardisés pour des résultats fiables. La détection des légionnelles dans l'eau chaude est cruciale pour prévenir la légionellose. Cette norme guide l'utilisation de techniques microbiologiques spécifiques pour identifier et quantifier ces bactéries pathogènes. Quatre méthodes de recherche sont décrites dans le **tableau VI**.

**Tableau VI :** Techniques de recherche et d'identification des légionnelles dans les eaux chaudes

Méthodes	Echantillon	Avantage	Inconvénients
Ensemencement direct	Eau avec une faible concentration de microorganismes interférents et une forte concentration d'espèce de légionnelle	Dénombrement aisé Bon rendement	Limite de détection élevée
Membrane filtrante sur boîte	Eau avec une faible concentration de microorganisme interférents et une faible concentration d'espèces de légionnelle	Méthode aisée Limite de détection basse	Dénombrement difficile en raison de croissance excessive de microorganismes interférents
Filtration avec procédure de lavage (c'est dans la partie matériel et méthodes)	Eau avec une forte concentration de microorganisme interférente	Dénombrement aisé limite de détection base	Rendement moindre Technique qui prend du temp
Ensemencement après dilution	Eau avec une très forte concentration de microorganisme interférente	Dénombrement aisé Bon rendement	Limite de détection élevée Technique qui prend du temp

ISO 11731/2017

***MATERIEL ET***  
***METHODES***

## I. MATERIEL ET METHODES

Notre étude a été menée au laboratoire du bactériologie des aliments, des eaux et de l'environnement de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), sur une période de quatre mois. Il s'agit d'une étude prospective menée en 04/02/2024 au 31/05/2024, portant sur toutes les souches de légionelles isolées à partir des systèmes d'eaux chaudes sanitaires de divers établissements résidentielles (hôteliers et hospitaliers) répartis dans différentes régions du pays.

### I.1. Matériel

Le matériel utilisé pour les différentes manipulations est mentionné dans l'**annexe II** ainsi que la composition des milieux de culture (**annexe II**).

### I.2. Méthodes

#### I.2.1. Mode de prélèvements

Au total, 63 prélèvements ont été recueillis auprès de différents établissements hôteliers et hospitaliers en Algérie, tout en préservant leur anonymat. Chaque prélèvement était accompagné d'une fiche de renseignements afin de fournir des informations supplémentaires sur les paramètres physiques, telles que la température lors du prélèvement, ainsi que sur l'origine du prélèvement. Cette démarche visait à obtenir une vue d'ensemble de la qualité microbiologique de ces eaux.

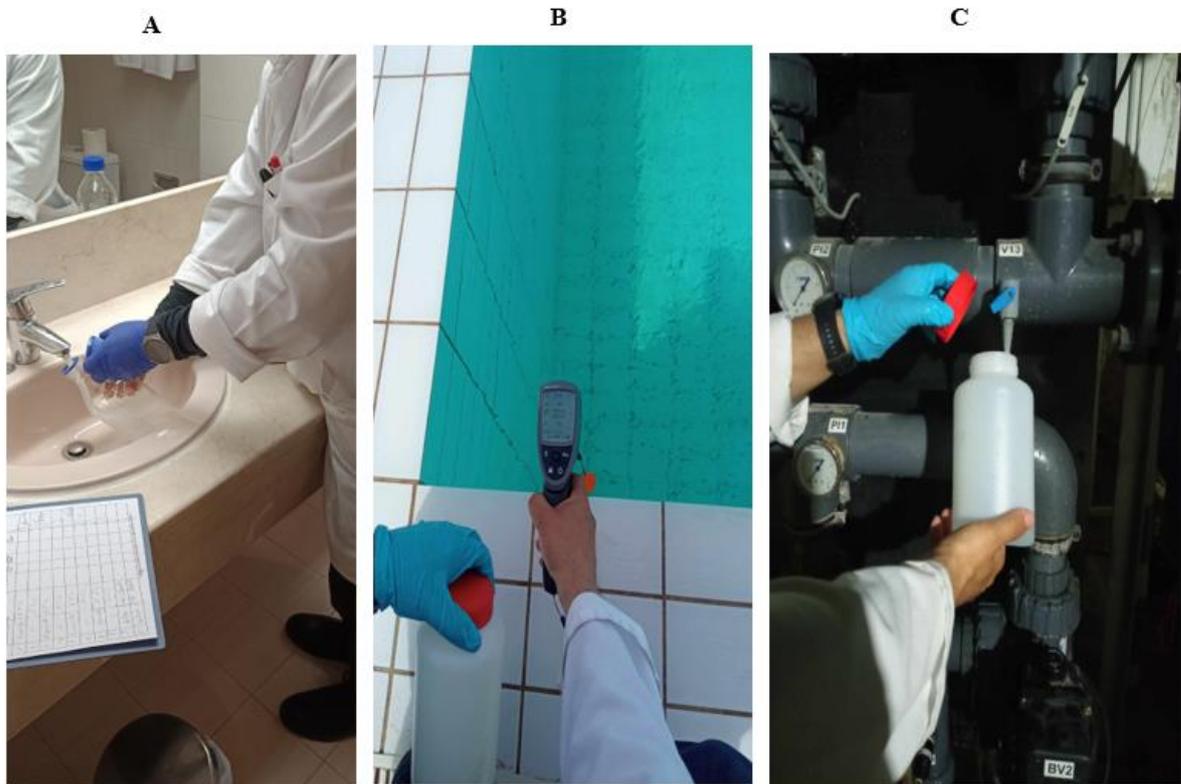
Pour les prélèvements, nous avons suivi les directives de la norme ISO 19458, qui a établi une méthode de collecte et d'analyse de l'eau pour détecter et évaluer la présence des légionelles. Les étapes de prélèvement et d'analyse conformément à la norme ISO 19458 sont les suivantes : (**figure5**)

- Identifier les points de prélèvement représentatifs en fonction du type d'installation et des risques potentiels de contamination par les légionelles.
- Assurer la propreté, la stérilité et le bon fonctionnement de tous les équipements de prélèvement, en désinfectant le point de prélèvement par flamage ou une solution désinfectante.
- Utiliser des flacons ou d'autres dispositifs de prélèvement recommandés pour collecter l'eau des points désignés. Pour les légionelles, le volume du prélèvement est d'un litre et la température doit être comprise entre 37°C et 50°C.

## Materiel et methodes

---

- Accompagner le prélèvement d'une fiche contenant toutes les informations pertinentes (température, date, heure, établissement de prélèvement).
- Transporter le prélèvement dans une glacière en respectant les recommandations de la norme ISO 19458 à une température de (5-8 °C).

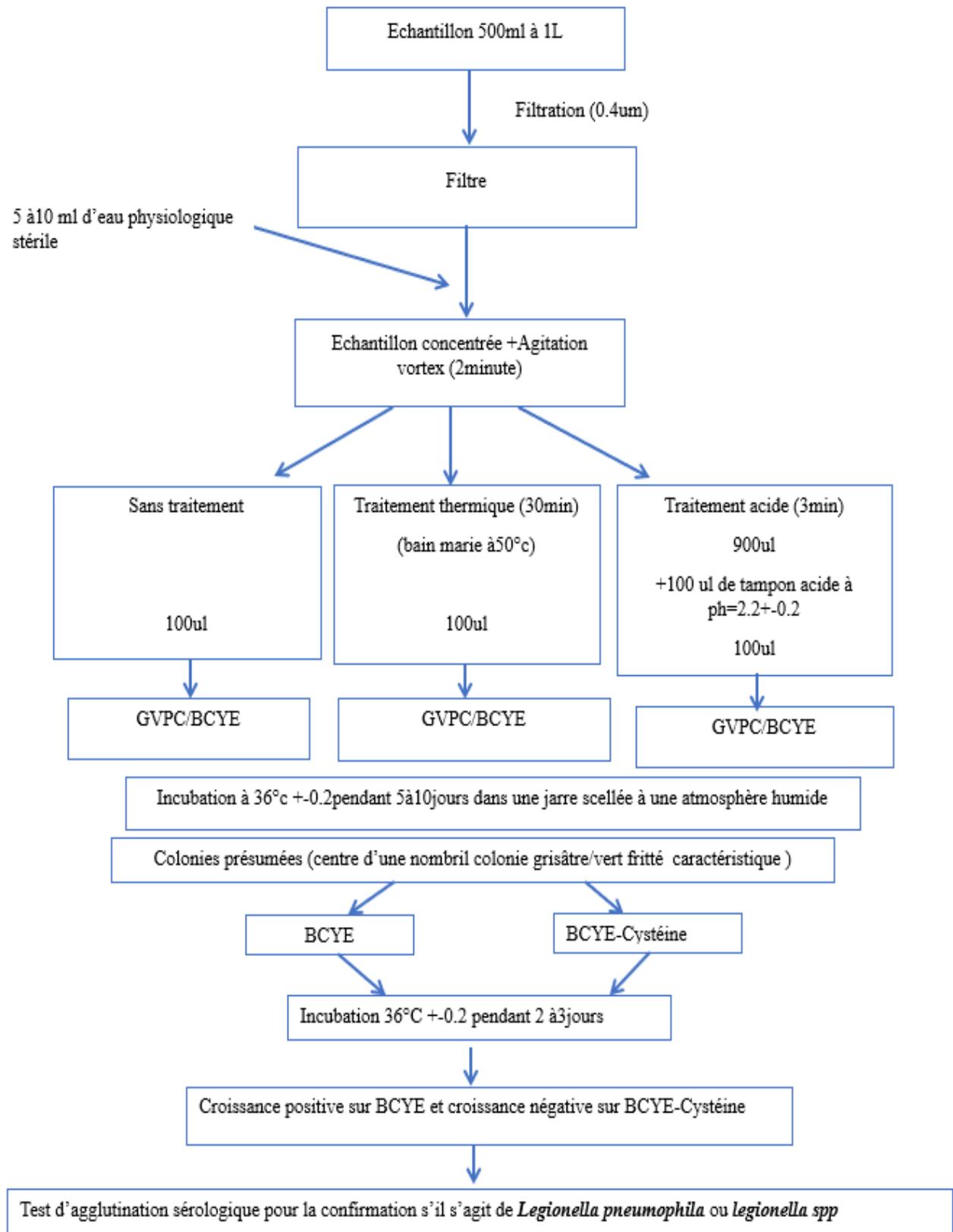


**Figure 5:** Les origines variées des prélèvements de légionelles (**photo originale, 2024**)

**A :** Robinet mixte ; **B :** Piscine ; **C :** Adoucisseur

Pour la suite de l'étude, la figure suivante résume les principales étapes du l'organigramme expérimental réalisé : (**figure6**)

## Materiel et methodes



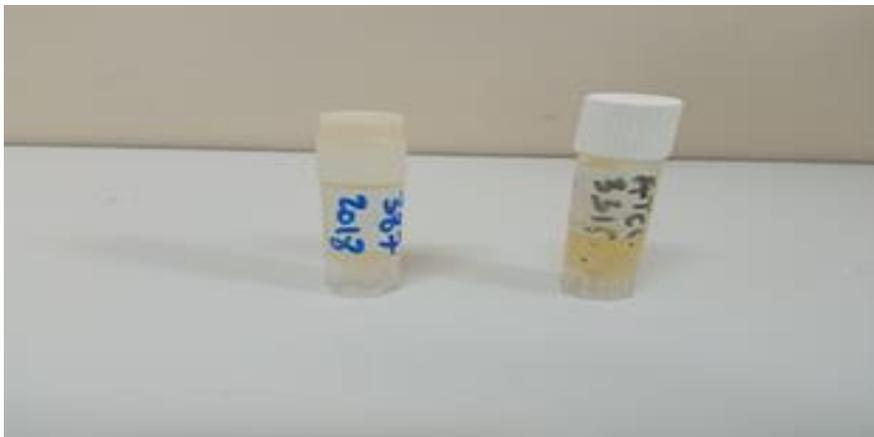
**Figure 6:** Schéma illustrant les principales étapes du protocole expérimental réalisé

## I.2.2. Isolement et recherches de légionelle dans les eaux chaudes

### I.2.2.1. Etude comparative pour la sélection de la base utilisée pour la préparation des milieux de culture GVPC et BCYE :

Afin de sélectionner le milieu de culture favorable permettant un meilleur isolement de la souche *Legionella pneumophila*, nous avons isolé chaque souche, y compris *Legionella pneumophila* ATCC 3315 et la souche (non-*Legionella pneumophila*) 387 2018, sur deux bases de milieux différents (**Annexe II**): (**figure 7**)

- ✓ Milieu préparé à base d'une poudre issue d'un fournisseur (BCYE alpha) CM1203.
- ✓ Milieu préparé à base d'une poudre issue d'un fournisseur (BCYE alpha) CM0655.



**Figure 7:** Deux souches de référence 387 2018 et ATCC 3315 (**photo original, 2024**)

La norme ISO 11731 recommande plusieurs méthodes pour la recherche et le dénombrement de légionelles. Cependant, le choix de la méthode est adapté au type d'eau analysée, à la charge en impuretés et en bactéries de l'échantillon, à la disponibilité du matériel et des réactifs, ainsi qu'au fonctionnement du laboratoire de bactériologie des aliments, des eaux et de l'environnement de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Dans cette étude, nous avons utilisé la méthode de filtration avec procédure de lavage, permettant l'analyse d'une eau présentant une forte concentration de microorganismes interférents et l'isolement des légionelles.

L'échantillon concentré est divisé en trois portions et soumis à deux traitements :

- **Traitement thermique** : l'échantillon (100 µl) est placé dans un bain-marie à 50 °C pendant 30 minutes.

## Materiel et methodes

---

- **Traitement acide** : 100 µl de la solution acide (A+B) (**protocole voir annexeII**) sont ajoutés à 900 µl de l'échantillon concentré, et l'échantillon est laissé à un pH de  $2.2 \pm 0.2$  pendant 3 minutes.
- **Sans traitement** : une portion de 100 µl estensemencée directement après filtration sur BCYE ou GVPC.

### I.2.2.2. Lecture et confirmation :

Les colonies de légionnelles observées sur les milieux BCYE/GVPC affichent généralement une coloration blanche ou grisâtre. Leur surface est lisse, avec un bord distinct et bien défini, donnant l'apparence de verre pilé. Le centre de ces colonies présente souvent une dépression, semblable à un nombril.

- Examiner et dénombrer les colonies caractéristiques de chaque boîte (partie dénombrement des colonies suspectes de légionnelles) afin de sélectionner deux colonies isolées caractéristiques pour isolement en parallèle sur milieu BCYE et BCYE sans cystéine.
- Mettre à incuber ces boîtes à  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 2 à 3 jour.
- Lecture : est considérée comme légionnelle toutes les colonies qui se développent sur le milieu BCYE et qui ne se développe pas sur le milieu BCYE-Cystéine.

### I.2.2.3. Dénombrement des colonies suspecte de légionnelles :

Pour estimer le nombre d'unité formant colonie de *Legionella* dans l'échantillon d'eau original sélectionner la boîte ou le groupe de boîtes (provenant du même milieu de culture présentant le nombre maximal de colonies).

Le calcul se fait à l'aide de la formule suivante :

✚ filtration avec procédure de lavage

$$Cs = \frac{a * Vc}{V * Vtot} * Vs$$

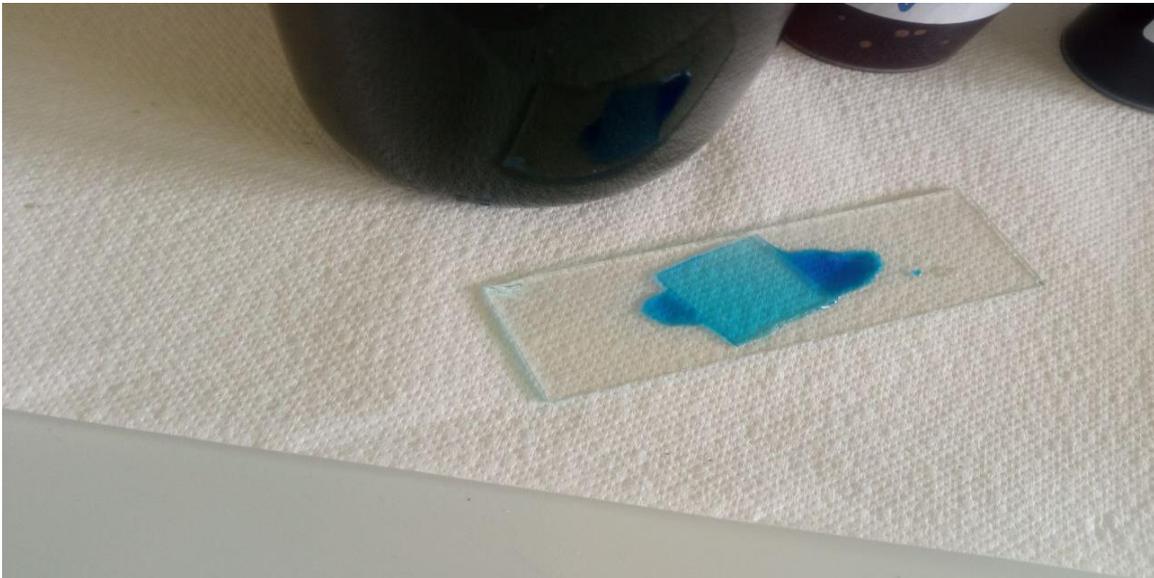
- Cs est le nombre d'UFC/l de légionnelle ;
- a est le nombre calculé de colonies de légionnelles confirmées ;
- Vc est le volume de l'échantillon (concentré) en millilitres (ml) ;
- V est le volume d'échantillon inoculé par boîte ou groupe de boîtes en millilitres (ml) ;
- Vtot est le volume totale d'échantillon analyser en millilitres (ml) ;

- $V_s$  est le volume de référence choisi pour exprimer la concentration des micro-organismes dans l'échantillon (1000ml normalement).

### I.2.3. Identification microscopique

#### I.2.3.1. Observation à l'état frais

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, nous isolons une colonie caractéristique de *Legionella pneumophila* séro groupe 2-14. Nous avons ensemencé cette colonie sur une lame contenant une goutte d'eau physiologique et la laissons sécher soigneusement après l'avoir étalée sur la lame. Ensuite, nous ajoutons une petite goutte de bleu de méthylène (**Figure 8**). Nous passons directement à l'observation microscopique au grossissement 10x100 (après ajout d'une goutte d'huile à immersion) (**Protocole Annexe III**).



**Figure 8:** Lame après coloration au bleu de méthylène

(Laboratoire de bactériologie de l'eau et de l'environnement) (photo originale, 2024)

#### I.2.3.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une méthode de coloration utilisée pour classer les bactéries en deux catégories principales, basées sur la différence de composition chimique de leurs parois cellulaires (**protocole voire annexe III**) (**figure 9**).

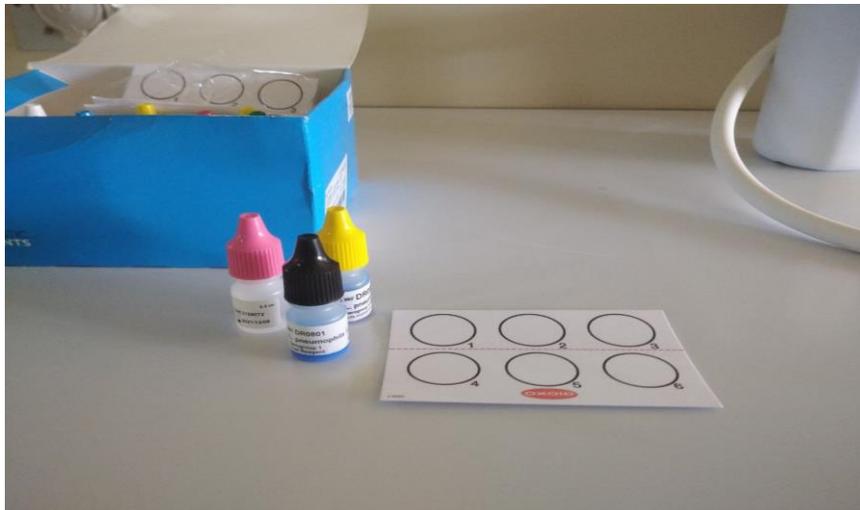


**Figure 9:** : Coloration de gram pour la souche ET24 de *Legionella pneumophila* (Laboratoire de bactériologie de l'eau et de l'environnement) (photo originale, 2024)

### I.2.4. Identification biochimique

#### I.2.4.1. Test d'agglutination sérologique pour identification de légionelle

Ce test est utilisé pour l'identification du sérotype de Légionelles en utilisant des réactifs contenant des particules de latex. Il permet de déterminer si la souche appartient au sérotype 2-14 ou au sérotype 1 (le plus pathogène). Il aide également à déterminer s'il s'agit de *Legionella spp* (figure 10) (protocole annexe III).



**Figure 10:** Test latex pour identification sérologique des légionelles (photo originale, 2024)

#### I.2.5. Identification taxonomique par MALDI-TOF EXS2600

L'appareil MALDI-TOF permet une analyse rapide et précise de la composition des échantillons biologiques en utilisant la désorption/ionisation assistée par une matrice et la mesure du temps de vol des ions formés. Il s'agit d'un outil extrêmement puissant en biochimie, en microbiologie et dans d'autres domaines de la recherche biomédicale. Le MALDI-TOF

## Matériel et méthodes

---

EXS2600 utilise un laser ultraviolet (UV) pour l'ionisation des échantillons, avec une longueur d'onde généralement comprise dans la gamme des 37 nm ou 355 nm (**figure 11**).

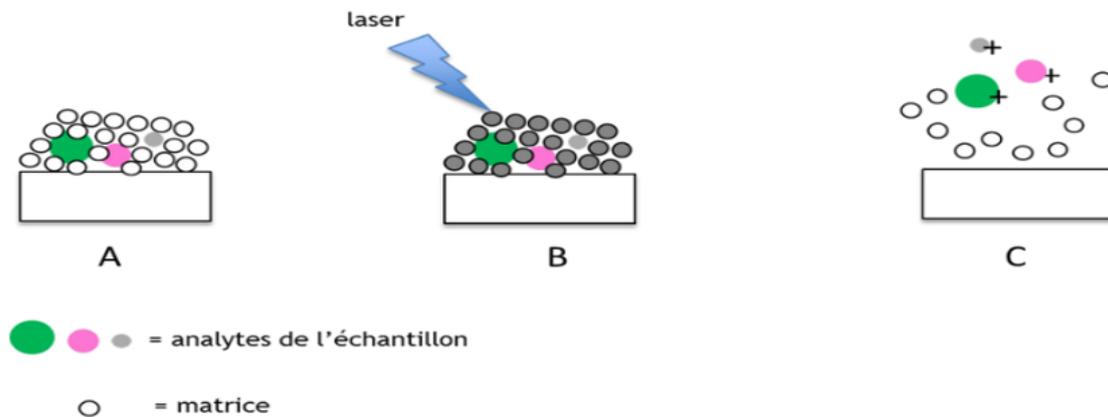


**Figure 11:**Appareil MALDI-TOF EXS2600 (photo prise à l'IPA. Département bactériologie médicale) (photo originale, 2024)

Le principe de la technique repose sur la désorption/ionisation douce des protéines, permettant la séparation en phase gazeuse des molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). La spectrométrie de masse est utilisée pour l'identification de plusieurs espèces bactériennes simultanément, grâce à ses 96 spots différents.

Les cultures bactériennes doivent être jeunes ou une souche bactérienne bien isolée. Une colonie suspecte est prélevée et déposée sur une plaque en métal (**protocole Annexe III**).

La première étape d'identification consiste en la désorption/ionisation douce des protéines de l'échantillon. Cette opération est réalisée à l'aide d'une matrice photosensible et d'un laser appelé MALDI. La matrice est déposée sur le spot et se cristallise avec l'échantillon lors de l'évaporation. La plaque est ensuite insérée dans le spectromètre où un laser, généralement un laser à azote d'une longueur d'onde de 337 nm, excite les molécules de la matrice photosensible, provoquant une ionisation par transfert d'un proton de la matrice vers l'échantillon, ainsi qu'une désorption de l'échantillon vers la phase gazeuse (**voir Figure 12**).



**Figure 12:** Principe de la désorption -ionisation laser assistée par matrice (Martin, 2020)

**A :** Cocrystallisation de l'échantillon et d'une matrice photosensible sur la plaque MALDI

**B :** Excitation des molécules photosensibles de la matrice par un laser

**C :** Ionisation et désorption de l'échantillon

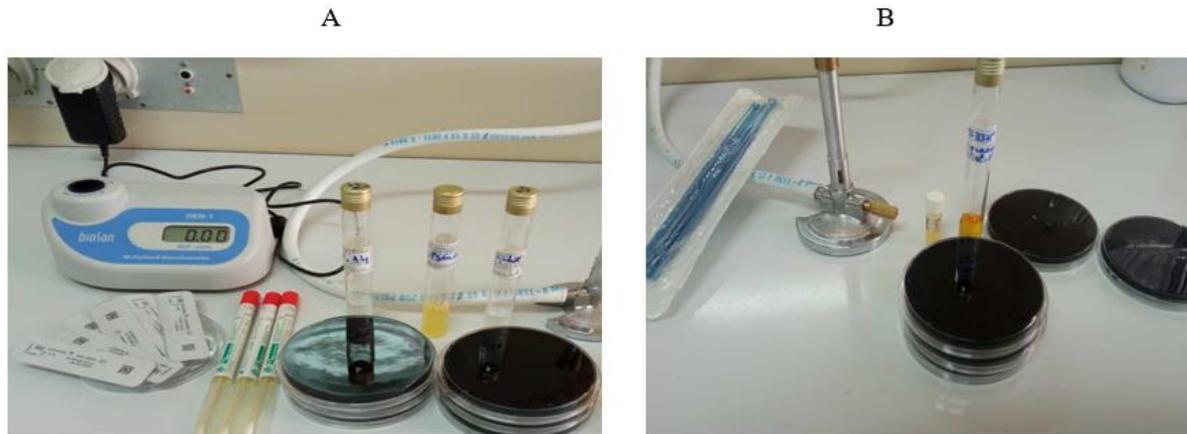
### I.2.6. Antibiorésistance des légionelles dans les eaux chaudes

L'objectif principal est de déterminer le niveau de sensibilité aux antibiotiques des souches environnementales de *Legionella pneumophila*, séro groupe 1 et séro groupe 2-14 et *legionella spp* isolées à partir des systèmes d'eau chaude.

Pour évaluer la CMI de *Legionella* vis-à-vis d'un antibiotique, nous avons utilisé une technique extracellulaire, à savoir **la diffusion en milieu solide utilisant des bandelettes imprégnées d'antibiotique (Etest)**. Cette méthode est en accord avec les réflexions de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Étant donné l'absence de normes CLSI pour les légionelles, nous avons utilisé dans cette étude cette technique pour déterminer la CMI des antibiotiques les plus efficaces sur les souches de légionelles.

Nous avons analysé la résistance aux antibiotiques de six souches sauvages de *Legionella pneumophila* séro groupe 2-14, ainsi qu'une souche sauvage du séro groupe 1, et une souche sauvage de *Legionella spp* et la souche de référence ATCC (3315). Cette étude a porté sur trois antibiotiques : la Ciprofloxacine (CI), l'Ampicilline (AM) et l'Amoxicilline + Acide Clavulanique (XL) (**figure 13**) (**protocole pour l'antibiorésistance Annexe IV**)



**Figure 13:** Réalisation de l'antibiogramme avec E test pour les souches sauvages des légionelles (souche 1 jusqu'as la souche 6 pour *L pneumophila* LP2-14 ; *L pneumophila* LP1 ; *Legionella spp* ; souche *L pneumophila* ATCC3315) en utilisant la Ciprofloxacin, Ampicilline et Amoxicilline +Acide clavulanique (**photo original, 2024**)

**A :** Souches sauvages de légionelles

**B :** Souche *L pneumophila* ATCC 3315

### I.3. Conservation des souches

#### I.3.1. Conservation dans la chambre froide :

Les échantillons sont conservés directement dans les GENbag (Biomérieux) et sont ensuite acheminés vers la chambre froide (**annexe IV**) (**figure 14**).



**Figure 14:** Conservation de la souche *Legionella pneumophila* séro groupe 1 et séro groupe 2-14 dans GEN bag(**laboratoire de bactériologie de l'eau et de l'environnement**) (**photo originale, 2024**)

### I.3.2. Conservation dans les tubes de conservation :

Cette méthode est la plus simple et facile à réaliser. Elle consiste tout simplement de sélectionner deux à trois colonies présentant les caractéristiques morphologiques typiques de *Legionella pneumophila* (après avoir réalisé le test latex sur la souche isolée et identifiée), puis de repiquer ces colonies au centre d'un tube de conservation, en respectant les conditions de stérilité (**Figure15**).

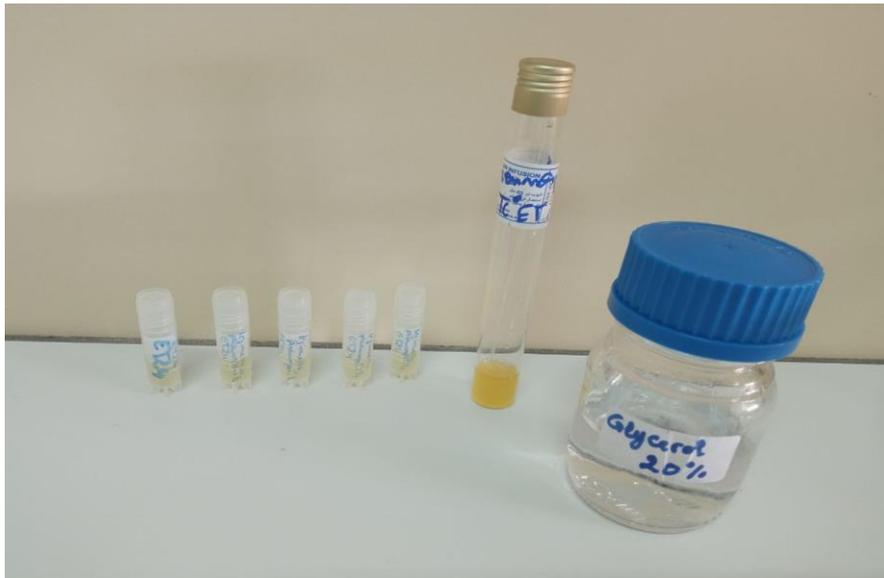


**Figure 15:** Conservation des souches sauvages de *Legionella pneumophila* séro groupe 2-14 et 1 (Laboratoire de bactériologie de l'eau et de l'environnement) (photo originale, 2024)

### I.3.3. Conservation des souches dans les cryotubes

Cette méthode consiste à réaliser une suspension bactérienne à partir d'une colonie caractéristique de *Legionella pneumophila* dans le bouillon BHIB. Après incubation pendant 24h, on prend 0.5 ml de BHIB et on l'ajoute à 0.5ml de glycérol (à 20%) dans le cryotube.

Le but d'utilisation de ce cryotube c'est protéger contre la destruction par les cristaux lors la congélation dans la chambre froide (**figure 16**).



**Figure 16:** Conservation de la souche *Legionella pneumophila* dans les cryotubes (Laboratoire de bactériologie de l'eau et de l'environnement) (photo originale,2024)

### I.4. Analyse des données

Une analyse statistique a permis d'évaluer la prévalence des souches pathogènes de *Legionella* dans les eaux chaudes en Algérie, d'étudier la répartition des souches de *Legionella* selon leur origine et leur localisation, ainsi que d'analyser leur antibiorésistance dans les eaux chaudes. Les résultats ont pour objectif de constater l'existence d'une différence statistique significative entre les paramètres analysés.

Pour évaluer la relation entre la prévalence de *Legionella* et la région, ainsi que la relation entre la prévalence de *Legionella* et l'origine, nous avons respectivement utilisé le test exact de Fisher. La comparaison des moyennes de deux groupes de *Legionella* en fonction de la température a été effectuée à l'aide du test t de Student, qui calcule la valeur p pour évaluer la significativité statistique. Cette analyse permet de déterminer si la différence observée entre les deux moyennes est statistiquement significative.

- Non significative si  $P > 0.05$
- Significatif si  $P < 0.05 (*)$
- Significatif si  $P < 0.01 (**)$
- Très significative si  $P < 0.001 (***)$

- Hautement significative si  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*)

Les différentes données ont été représentée graphiquement par logiciel Excel 2019 et le langage R.4.0.0.(logiciel R).

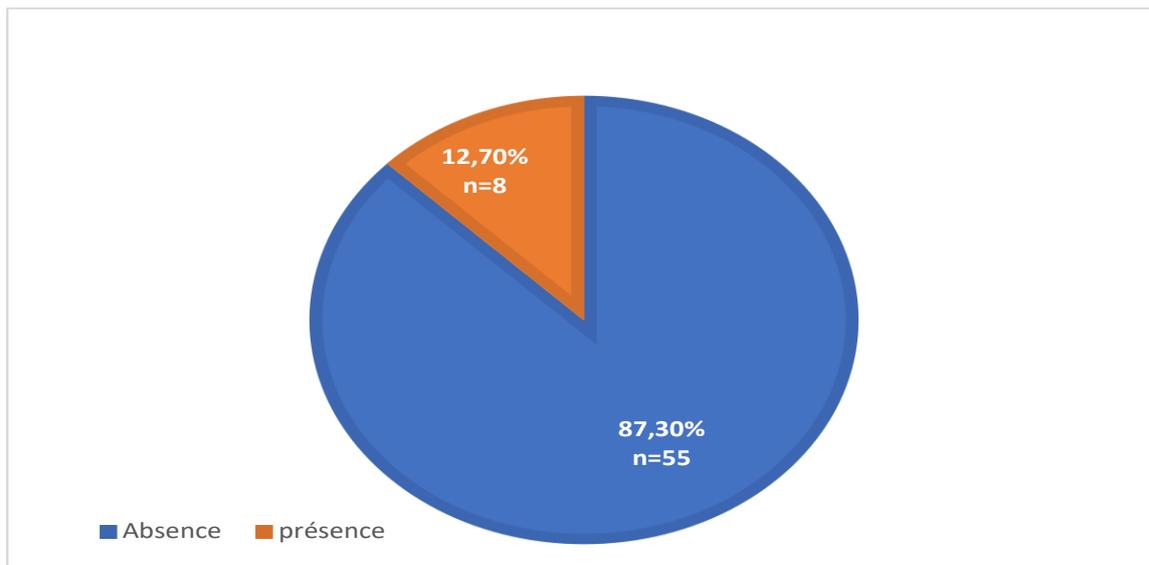
***RESULTATS ET  
DISCUSSION***

## II.RESULTATS ET DISCUSSION

Sur une période d'étude allant du mois de février jusqu'au mois de mai 2024, 63 échantillons ont été prélevés à partir de différents établissements hôteliers et hospitaliers situés dans différentes régions.

### II.1. Répartition des échantillons selon la présence /absence des légionelles

Les résultats d'identification des légionelles dans les eaux chaudes sont indiquées dans la **figure 17**.



**Figure 17:** Répartition des échantillons selon la présence /absence des légionelles

Au cours de notre étude nous avons isolé 8 souches de légionelles, ce qui correspond à un taux de positivité de 12,70 %.

L'étude de **Seck et al., (2016)** en Sénégal Dakar avaient identifié 30 espèces de légionelle (17%) sur un totale de 177 échantillons. En revanche, ce taux de légionelles reste inférieur à celui retrouvé par **Assaidi, (2020)** en Maroc avec 77(51,7%) souche positive.

Les résultats obtenus pourraient être expliqués par :

- Selon **Anses (2011)** en France, L'analyse des légionelles nécessite un certain temps car leur croissance est relativement lente et requiert des milieux spécifiques contenant du fer et de la L-cystéine. Cela peut justifier le faible nombre d'échantillons positifs observer dans notre étude.
- Selon l'**Arrêté du 1er février 2010** pour les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire, il est essentiel de procéder à une analyse des

## Resultats et discussion

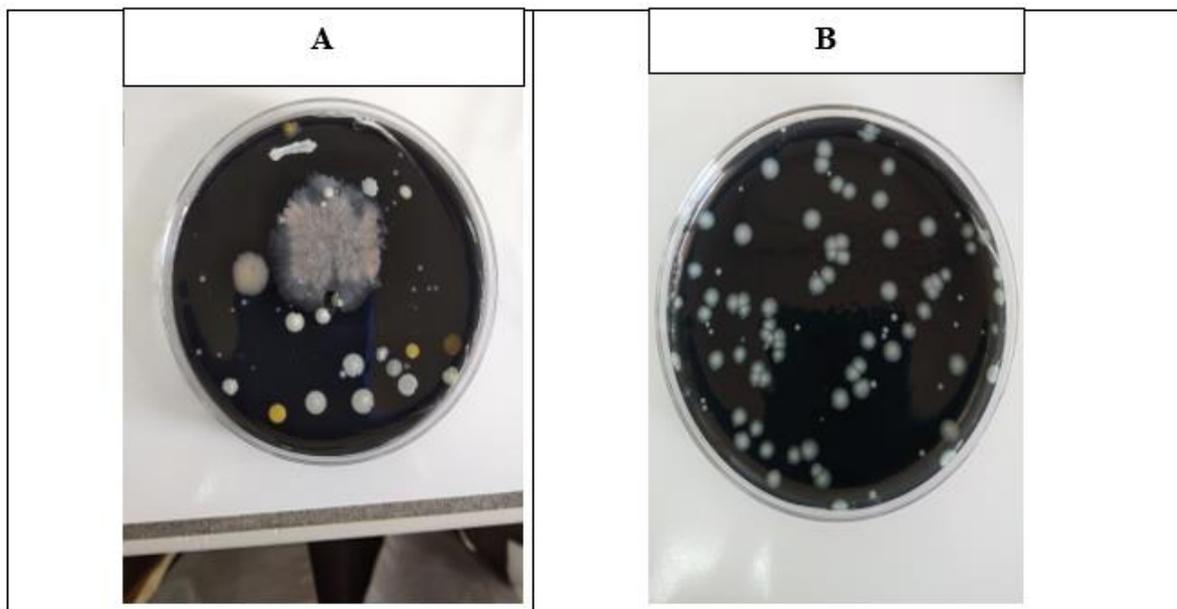
---

légionelles. Concernant la surveillance des légionelles en Algérie, l'absence de réglementation algérienne limite le nombre de prélèvements effectués.

### II.2. Résultats comparatifs pour la sélection de la base utilisée pour la préparation des milieux de culture GVPC et BCYE

Dans notre étude, nous avons comparé deux milieux de bases différents : le milieu de base d'un fournisseur Oxoid CM0655 et le milieu de base d'un fournisseur Oxoid CM1203. La présence d'acide cétooglutarique et le tampon ACES pour CM1203 ont favorisé une identification plus précise et discriminatoire des légionelles (**figure18**).

Selon l'Organisation internationale de normalisation, la base CM 1203 est utilisée avec succès pour détecter la présence de *legionella* dans les eaux des hôpitaux (**Nisar et al.,2023**).



**Figure 18:** Aspect caractéristique des légionelles (*Legionella pneumophila* ATCC3315) après isolement dans deux milieux de base différent (**photo original, 2024**).

**A :** Des légionelles dans le milieu BCYE de la base CM0655

**B :** Des légionelles dans le milieu GVPC de la base CM1203

La particularité de ce milieu se base sur la présence du tampon ACES qui garantit le maintien du pH et crée une aérobose dans les milieux (**Anses, 2011**) et l'acide alpha cétooglutarique qui est un métabolite trouvé chez *Pseudomonas aeruginosa* (**Yeterian, 2010**). Ce métabolite fourni par *Pseudomonas aeruginosa* favorise la prolifération de *Legionella pneumophila* (**Abu khweek et Amer, 2018**).

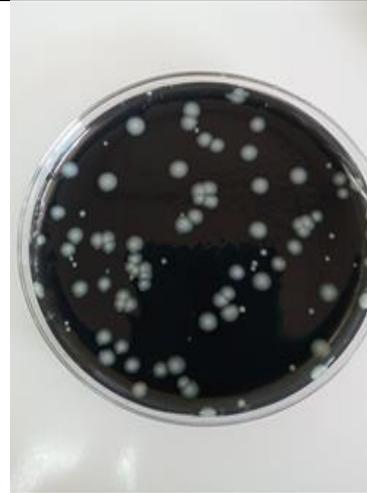
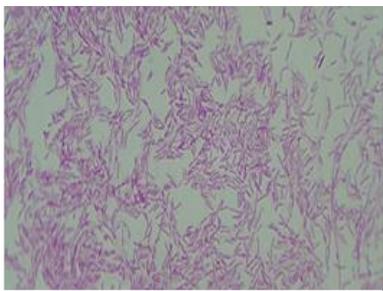
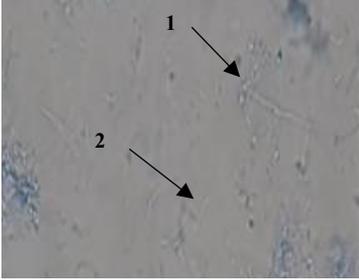
# Resultats et discussion

## II.3. Résultats de l'identification

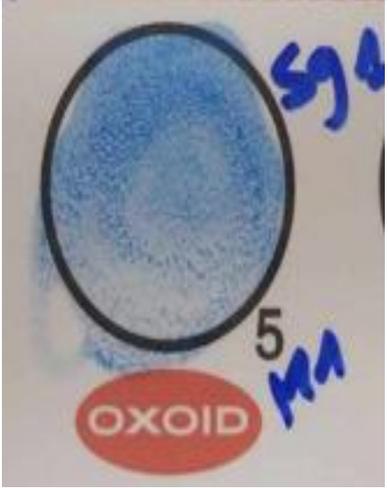
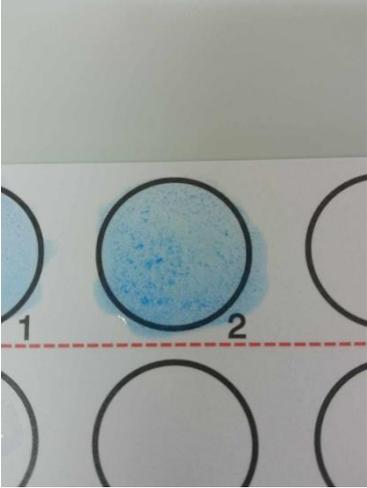
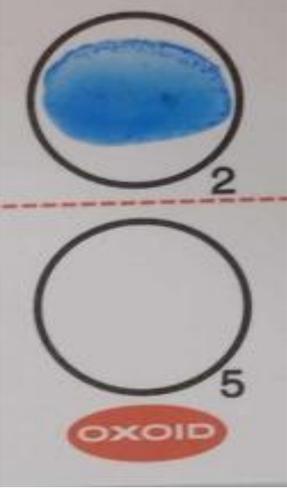
Après isolement et purification des souches bactériennes sur les différents milieux utilisés, les isolats bactériens ont montré un aspect culturaux caractéristique des légionelles, permettant de suspecter leur appartenance à un sérotype bactérien des *Legionellaceae*.

L'aspect des colonies, l'observation macroscopique et microscopique, les caractères sérologiques sont résumés dans le **tableau VII**.

**Tableau VII** : Résultats de l'identification de trois souches appartenant à la famille des *Legionellaceae*.

Aspect macroscopique				
	A	B	C	
Colonie grisâtre avec un centre nombril entouré de bordures en verre fritté				
Aspect microscopique	<p style="text-align: center;">Etat colorée</p>  <p style="text-align: center;">De longs bacilles colorés en rose (<b>Gram-</b>)(GX1000)</p>		<p style="text-align: center;">Etat frais</p>  <p style="text-align: center;">1. un groupe de long bacille 2. un bacille long</p>	

## Resultats et discussion

Test d'agglutination (Sérologique)			
	Serogroup 1	Serogroup 2-14	Legionella species

Selon les caractères macroscopiques, microscopique et l'identification sérologique, nous avons conclu que :

- **Souche A** : *Legionella pneumophila* sérogruppe 1
- **Souche B** : *Legionella pneumophila* sérogruppe 2-14
- **Souche C** : *Legionella spp*

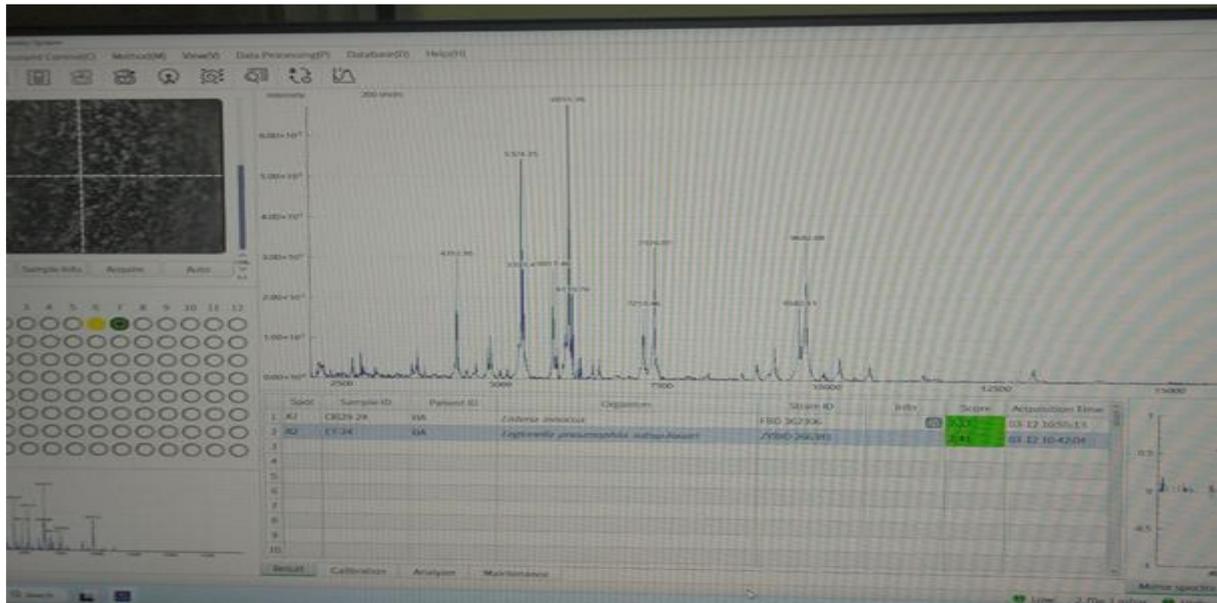
Dans notre étude, notre choix s'est porté sur les légionelles due à leur fréquente présence dans les établissements résidentielles (hospitaliers et surtout les établissements hôteliers). Ces bactéries sont souvent impliquées dans la survenue d'infections pulmonaires.

Dans une étude menée par **Seck et al., (2016)**, l'auteur a également identifiée des souches de *Legionella pneumophila* sérogruppe 1 et *Legionella pneumophila* sérogruppe 2-14 dans les établissements hôteliers et hospitaliers au Sénégal.

Dans un autre travail réalisé par **Assaidi, (2020)** a identifié deux souches *Legionella spp* isolées à partir des systèmes d'eau chaude des établissements hôteliers au Maroc.

### II.4. Résultats de l'identification taxonomique par MALDI-TOF

Le processus d'identification d'une colonie isolée à partir d'un milieu BCYE contenant de la cystéine (CM1203) est effectué à l'aide d'un automate MALDI-TOF, ce qui permet de détecter la présence de l'espèce *Legionella pneumophila* sub espèce *Fraseri* (**figure19**).



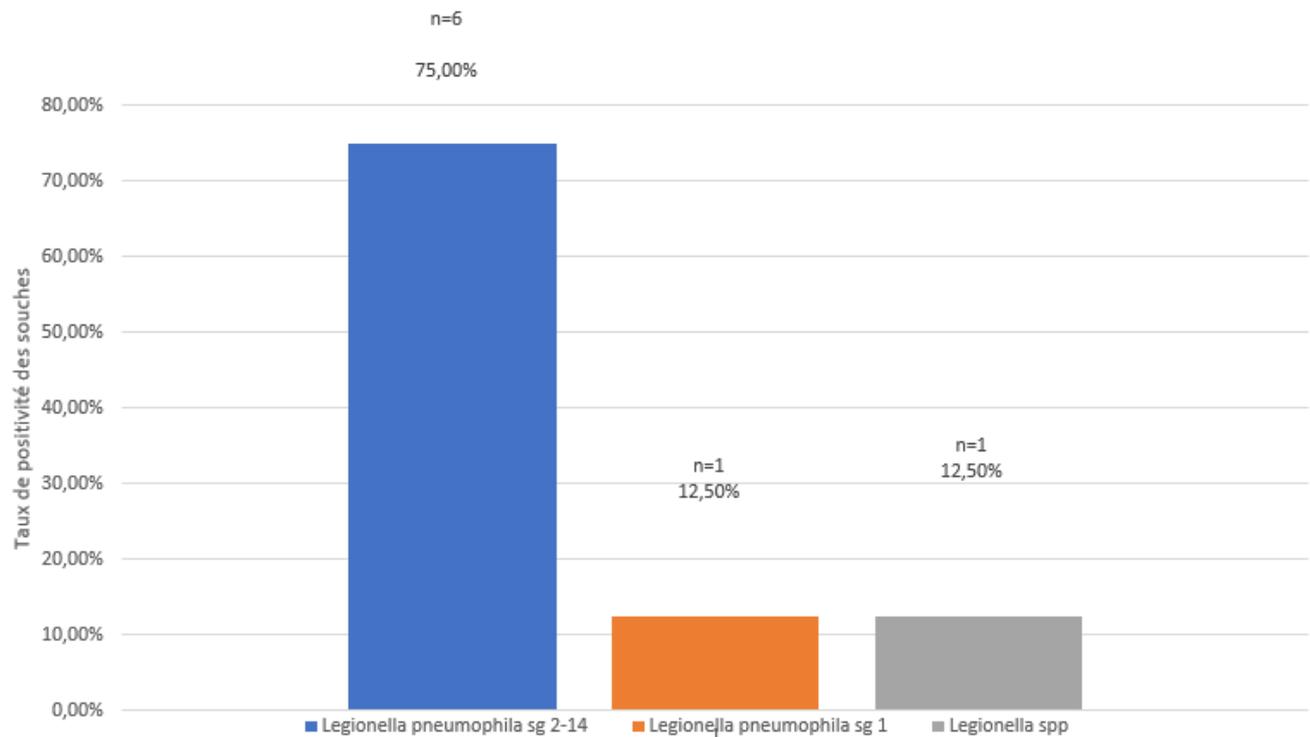
**Figure 19:** Identification de l'espèce *Legionella pneumophila* sg2-14 sub espèces *fraseri* par MALDI-TOF EXS2600 (photo original, 2024)

La technique MALDI-TOF a réussi à identifier toutes les huit espèces de *Legionella* les plus souvent responsables des maladies humaines (**Biswas et Rolain,2013**).

Par rapport aux résultats de **Moliner et al., (2010)** ont également identifiée *Legionella pneumophila* sub espèce *Fraseri* parmi 114 souches de *L. pneumophila* en utilisant la technique MALDI-TOF.

### II.5. Répartition des espèces de légionelles

Les résultats ont montré que les souches les plus couramment répondues étaient celles de *Legionella pneumophila* séro groupe 2-14 (75%, n=6), suivies de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 (12,50%, n=1) et de *Legionella spp* (12,50%, n=1) (**figure 20**).



**Figure 20:** Répartition des espèces de légionelles

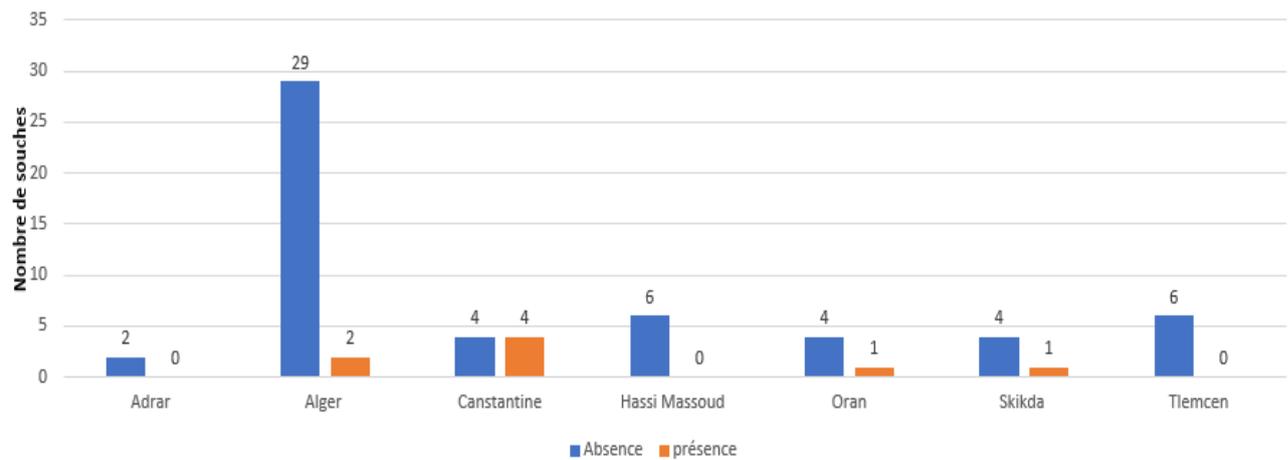
**Assaidi, (2020)** a identifié 20 souches *L. pneumophila* sg1 (33,33%), 38 souches de *L. pneumophila* sg2-14 (63,33%) et deux souches *Legionella spp* (3,33%) à partir d'un total de soixante souches de *Legionella* isolées des systèmes d'eau des établissements hôteliers.

**Sandalakis et al., 2014** ont révélé bien que *Legionella pneumophila* sg 1 soit habituellement la principale cause de la légionellose chez l'homme, d'autres types de *Legionella* ont également été impliqués dans la maladie. Parmi ceux-ci, on trouve *L. pneumophila* sg 2, *L. pneumophila* sg 5, *L. pneumophila* sg 6, ainsi que d'autres espèces comme *L. anisa* et *L. rubrilucens*, qui ont été associés à des cas humains de pneumonie ou de fièvre de Pontiac. Cependant en 2020, la recherche sur la légionellose a connu une baisse des tests en raison de la pandémie de SARS-CoV-2 (**keše et al., 2021**).

### II.6. Évaluation de la relation entre la prévalence de *Legionella* et la région

La répartition des souches de légionelles selon la région pendant une période de quatre mois est présentée dans la figure 21 (**tableau VIII, voir annexe V**).

## Resultats et discussion



**Figure 21:** Répartition des légionelles selon la région

La figure précédente a révélé une prévalence élevée des légionelles dans la région de Constantine (7.27%, n=4), en comparaison avec les autres régions examinées : Alger (3.63%, n=2), Oran (1.81%, n=1), Skikda (1.81%, n=1). En revanche, nous avons observé une absence des légionelles dans les échantillons provenant des régions de Adrar, Hassi Massoud, Tlemcen. Ceci a été confirmée par le test de Fisher qui a révélé une différence significative (p-value=0,05) dans la présence de *Legionella* en fonction des régions.

D'après une étude menée par **khaledi et al., (2018)** La prévalence des espèces de *Legionella* dans les ressources en eau d'une région d'Iran affichait un taux le plus élevé, atteignant 55,7 %, n=5. Néanmoins, la valeur p liée à ces observations était de 0,07, tandis que nos propres résultats montraient une signification significative avec une valeur p de 0,05.

Deux paramètres principaux expliquent la différence de prévalence entre les régions.

Le changement climatique a un effet sur les micro-organismes aquatiques pathogènes. Prenons l'exemple des conditions météorologiques telles que le vent, l'ensoleillement et l'humidité, qui peuvent avoir un impact sur la survie des légionelles dans les aérosols. Si la température atmosphérique augmente par rapport à la moyenne saisonnière, cela peut entraîner une augmentation de l'utilisation des systèmes de conditionnement de l'air, ce qui favorise la propagation des légionelles (**Toni et al., 2009**).

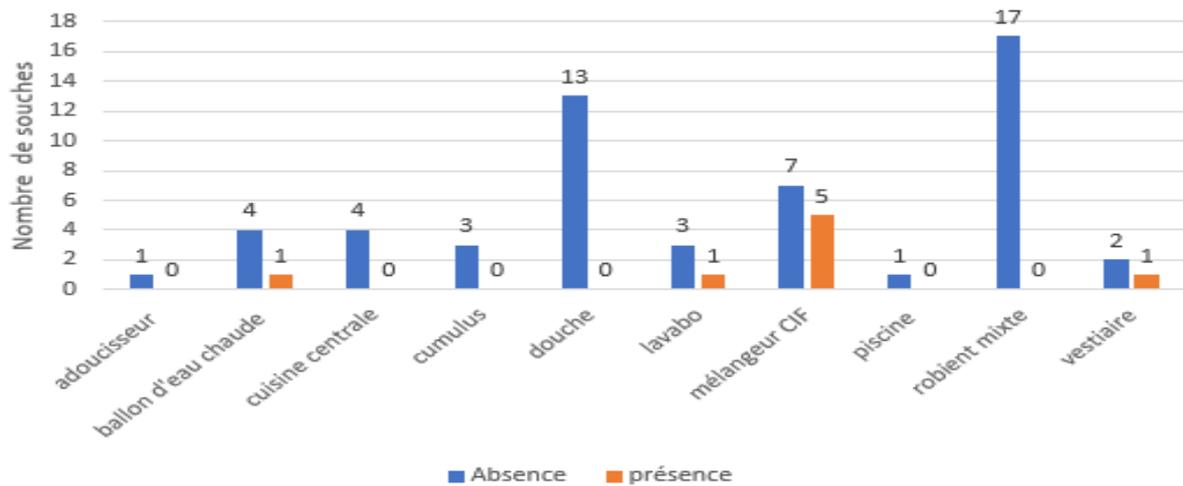
En outre, la composition chimique de l'eau est essentielle. Une étude en Hongrie a montré que la numération des légionelles est fortement liée à la plupart des paramètres chimiques de l'eau (Demande chimique en oxygène (mg/L O<sub>2</sub>), Fer (mg/L), Manganèse (mg/L),

## Resultats et discussion

pH, Sodium (mg/L), nitrite(mg/L), nitrate(mg/L)), mettant ainsi en évidence leur rôle dans la fréquence de ce type de bactéries (Barna *et al.*, 2016).

### II.7. Evaluation de la relation entre la prévalence de *Legionella* et l'origine du prélèvement

La répartition des souches de légionelles selon l'origine du prélèvement pendant une période de quatre mois est représentée dans la figure 22 (tableau IX, voir annexe V).



**Figure 22:** Répartition des légionelles selon l'origine du prélèvement

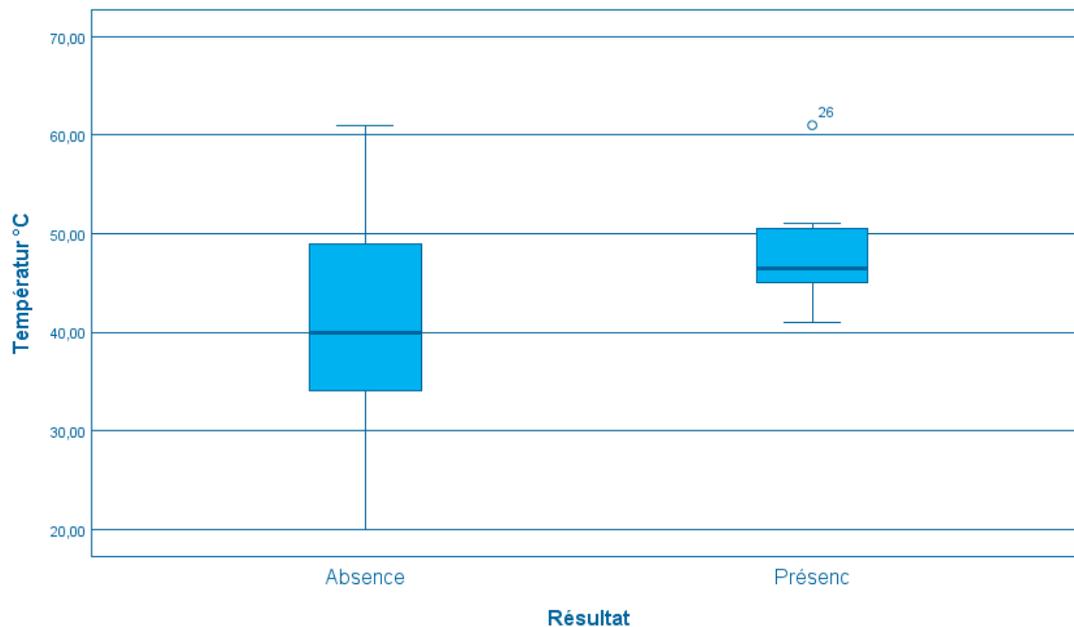
Les résultats ont révélé une concentration notable de légionelles dans les mélangeurs CIF, avec un échantillon représentatif (7,93%, n=5). De plus, la présence de *Legionella pneumophila* a également été observée dans un lavabo (1,58%, n=1), un vestiaire (1,58%, n=1) et un ballon d'eau chaude (1,58%, n=1). En revanche, nous avons observé une absence des légionelles dans les échantillons prévenant de différents origines : adoucisseur (1,58%, n=1); ballon d'eau chaude (6,34%, n=4); cuisine centrale (6,34%, n=4); cumulus (4,76%, n=3); douche (20,63%, n=13); lavabo (4,76%, n=3); mélangeur CIF (7,93%, n=7); piscine (1,58%, n=1); robinet mixte (26,98%, n=17); vestiaire (3,17%, n=2).

Le test exact de Fisher a révélé une différence significative (p-value=0,02).

Différents facteurs peuvent expliquer les fluctuations des taux de légionelles présentes et absentes dans différentes installations, tels que les spécificités des systèmes de plomberie, les méthodes d'entretien, les niveaux de désinfectants, la température de l'eau et la présence de biofilms. Ces différents facteurs peuvent avoir un impact sur la croissance et la survie des légionelles dans les écosystèmes aquatiques (Buse *et al.*, 2012).

### II.8. Evaluation de la relation entre la présence de *Legionella* et la température de l'eau lors du prélèvement

La répartition des souches de légionelles selon la température de l'eau au prélèvement pendant une période de quatre mois est représentée dans la figure 23 (tableau X, voir annexeV)



**Figure 23:** Répartitions des légionelles selon la température

*Legionella* peut croître dans un intervalle de température allant de 41,21 °C à 53,28 °C, elle est souvent absente entre 37,50 °C et 43,57 °C

Le test de Student a révélé une différence significative entre ces deux groupes (p-value=0,01).

**Buse et al., (2012)** révèlent une corrélation claire entre les températures chaudes et la croissance des légionelles, confirmant que les températures idéales pour la prolifération des légionelles se situent entre 35 et 46 °C. De manière significative, les échantillons d'eau chaude prélevés à des températures inférieures à 60 °C sont cinq fois plus susceptibles de contenir des légionelles. En revanche, les températures dépassant 60 °C inhibent de manière significative la croissance des légionelles.

Afin d'expliquer cette fluctuation de température par les spécificités des systèmes de plomberie présents dans les bâtiments. Effectivement, les installations de plomberie des locaux sont très complexes sur le plan structurel, avec des distances parfois très importantes entre la

## Resultats et discussion

---

chaufferie et les robinets éloignés, pouvant s'étendre sur des centaines de mètres ; Ceci favorise la multiplication de *Legionella* (Assaidi, 2020).

### II.9. Résultat de l'antibiogramme

Les résultats de la sensibilité des souches environnementales de légionelles isolées aux antibiotiques testés selon les CMI des trois antibiotiques : (Ciprofloxacine, Amoxicilline +Acide clavulanique, Ampicilline) sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau XI** : Résultat d'antibiogramme en utilisant E test sur différent souche de légionelles

Souches	ciprofloxacine	amoxicilline + acide clavulanique	ampicilline
ATCC 3315 LP 2-14	0,75	0,032	0,19
<i>L pneumophila</i> LP2-14 (souche 1)	0,75	0,047	0,094
<i>L pneumophila</i> LP2-14(souche2)	0,75	0,047	0,094
<i>L pneumophila</i> LP2-14(souche3)	0,75	0,032	0,125
<i>L pneumophila</i> LP2-14(souche 4)	0,75	0,047	0,125
<i>L pneumophila</i> LP2-14(souche 5)	1	0,19	0,38
<i>L pneumophila</i> LP2-14(souche 6)	0,75	0,032	0,125
<i>L pneumophila</i> LP1	0,38	0,064	0,38
<i>Legionella spp</i>	1	0,032	0,125

La détermination de la sensibilité aux antimicrobiens a été divisés en 6 isolats appartenant au séro groupe 2-14 (Lp2-14), 1 au séro groupe 1(Lp1) et 1 *Legionella spp* et une souche de référence ATCC 3315(Lp2-14).

Il n'existe actuellement aucune norme internationale officielle largement acceptée pour le profil de résistance des légionelles, comme celles fournies par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) et le European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (Cocuzza et al., 2021).

Dans notre étude nous avons testé la sensibilité pour deux bêtalactamine (Ampicilline et Amoxicilline +Acide Clavulanique) et un groupe de fluoroquinolone la Ciprofloxacine, nous avons opté pour des valeurs cumulées d'isolats inhibés par différentes concentrations des trois agents antimicrobiens testés qui sont présentés dans le tableau précédent.

## Resultats et discussion

---

L'Amoxiciline + Acide clavulanique s'est avérée être l'antibiotique le plus actif avec des CMI de 0,032 et de 0,19 ug/ml. Selon **Pocidalò, (1993)** l'acide clavulanique associé avec l'amoxicilline présente une activité bactériostatique contre les légionelles.

La bêta lactamine (Ampicilline) présente une CMI entre 0,094 et 0,38 ug/ml pour les différentes souches de légionelles testées. Selon **EUCAST (2021)**, les bêta lactamines présentent une faible pénétration intracellulaire pour les légionelles avec une faible activité antimicrobienne entre 0,2 et 0,8 ug/ml (**Fu et Neu, 1979**).

La Ciprofloxacine présente des CMI entre 0,38 et 1 ug/ml, cet antibiotique a présenté une plus faible activité sur les légionelles que celle des deux autres antibiotiques (Ampicilline, Amoxicilline + Acide clavulanique). Selon **Bruin et al., (2014)** les légionelles présentent des mutations ponctuelles dans le gène gyrA conduisant à une résistance à la Ciprofloxacine qui est de 0,38 à 2 mg/l.

# ***CONCLUSION***

## CONCLUSION

La légionellose est une infection respiratoire grave souvent liée à la contamination de l'eau chaude dans les hôtels et les hôpitaux. La principale voie de transmission de cette bactérie se fait par l'eau chaude, notamment à travers les douches et les ballons d'eau chaude et les mélangeurs CIF. Les individus les plus vulnérables à cette maladie sont ceux dont le système immunitaire est affaibli, notamment par le tabagisme et la consommation excessive d'alcool.

Cette étude nous a permis de déterminer la prévalence de légionelles retrouvées dans l'environnement hôtelier et hospitalier, l'influence de la température sur la croissance de *Legionella* dans les systèmes de distribution d'eau chaudes ainsi que leur profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques.

Sur un total de 63 échantillons issus des établissements résidentiels (hôteliers et hospitaliers), seulement 8 échantillons ont été positifs pour les légionelles. Ces derniers sont isolés sur un milieu GVPC (CM1203). A partir des 8 échantillons, nous avons isolé 6 *Legionella pneumophila* 2-14 (une souche *Legionella pneumophila* séro-groupe 2-14 sub espèce *fraseri* identifiée par l'appareil MALDI-TOF EXS2600) puis 1 *Legionella pneumophila* 1 et 1 *Legionella spp.*

Les résultats de la prévalence de *Legionella* et la région, nous ont permis de noter que la région de Constantine présente une prévalence élevée en la comparant avec Alger, Skikda et Oran.

Pour la prévalence de *Legionella* selon l'origine de prélèvement, nous avons constaté que le mélangeur CIF présente le niveau de contamination le plus élevé avec (7,93%, n=5).

Notre étude a montré une corrélation significative ( $p = 0.01$ ) entre la température et la présence de légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire. Ces résultats indiquent que la température joue un rôle crucial dans la détermination de la présence ou de l'absence de légionelles dans ces environnements.

Cette étude menée dans les établissements résidentiels en Algérie examine les risques associés à la présence des légionelles dans les systèmes d'eau chaude sanitaire. Les résultats montrent une prévalence notable de ces bactéries, soulignant l'importance critique de surveiller et de contrôler ces installations pour prévenir tout risque potentiel pour la santé publique.

## CONCLUSION

---

Comme perspectives, il serait crucial d'approfondir notre compréhension sur la prévention et la gestion de cette bactérie dans les systèmes d'eau chaude, tout en explorant des stratégies innovantes pour renforcer la sécurité sanitaire :

- Utilisation de techniques d'identification avancées apportées par des technologies moléculaires, qui pourrait permettre d'identifier le cluster de *Legionella* dans différentes colonies et de surveiller ces organismes pour les variations génétiques et aussi pour gagner du temps pour une identification plus rapide et précise.
- La mise à jour de la réglementation concernant les normes individuelles de la qualité de l'eau chaude et la coopération étroite avec les autorités compétentes afin d'atteindre cet objectif et sensibiliser les établissements public mise en danger.
- L'étude des facteurs environnementaux autres que la température de l'eau pour leur impact sur la multiplication de *Legionella*, y compris la composition chimique de l'eau autour des tuyaux et de la vapeur.

*Référence*  
*bibliographique*

# Référence bibliographique

---

## Référence bibliographique

### (A)

**Abu Khweek, A. et Amer, A. O. (2018).** Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 38,1-10.

**Anne, Vianney. (2015).** " Légionelles et légionellose : de l'eau jusqu'à homme ". [Power point]. Conférence Equipe pathogénèse des légionnelles, Lion, Octobre 2015. [https://uo.univ-lyon1.fr/medias/fichier/a-vianney-legionnelles-et-legionellose-de-l-eau-jusqu-a-l-homme-16-fev-2017\\_1487777435881-pdf](https://uo.univ-lyon1.fr/medias/fichier/a-vianney-legionnelles-et-legionellose-de-l-eau-jusqu-a-l-homme-16-fev-2017_1487777435881-pdf).

**Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (2011).** Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau - Caractéristiques détaillées et pertinence de leur mise en œuvre dans les eaux chaudes sanitaires et les tours aéroréfrigérantes. p159.

**Appelt, S. et Heuner, K. (2017).** The Flagellar Regulon of *Legionella*-A Review. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 454, 1-12.

**Assaidi, A. (2020).** Contamination des eaux chaudes sanitaires par *legionella pneumophila* dans les établissements hôteliers du Maroc : caractérisation physicochimique, moléculaire et pouvoir adhésif. Thèse de doctorat en science biologique, Faculté des Sciences et des Techniques, Béni Mellal, Université Sultan Moulay Slimane, Maroc. p193.

### (B)

**Bai, L., Yang, W., Li, Y. (2023).** Clinical and Laboratory Diagnosis of *Legionella* Pneumonia. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 13(2), 280.

**Barna, Z., Kádár, M., Kálmán, E., Scheirich Szax, A. et Vargha, M. (2016).** Prevalence of *Legionella* in premise plumbing in Hungary. *Water research*, 90, 71–78.

**Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J.V., Pond, K. et Lee, S.S.(2007).** *Legionella and the Prevention of Legionellosis*. World Health Organization; 2007.p277. [https://books.google.dz/books/about/Legionella\\_and\\_the\\_Prevention\\_of\\_Legionellosis](https://books.google.dz/books/about/Legionella_and_the_Prevention_of_Legionellosis).

## Référence bibliographique

---

**Biswas, S., et Rolain, J. M. (2013).** Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *Journal of microbiological methods*, 92(1), 14–24.

**Bouvet, E.(2006).** La légionellose. *Médecine sciences*, 22(6-7),601-606.

**Brenner, D.J., Krieg, N.R. et Staley, J.R. (2007).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition, Volume Two: The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria.* Springer .23p.

**Bruin, J. P., Koshkolda, T., IJzerman, E. P., Lück, C., Diederens, B. M., Den Boer, J. W. et Mouton, J. W. (2014).** Isolation of ciprofloxacin-resistant *Legionella pneumophila* in a patient with severe pneumonia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 69(10), 2869-2871.

**Buse, H. Y., Schoen, M. E. et Ashbolt, N. J. (2012).** Legionellae in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure. *Water research*, 46(4), 921–933.

**Bush, L. M., Vazquez-Pertejo, M.T. (2024).** Legionella Infections. Disponible sur : <https://www.merckmanuals.com/professional/infectious-diseases/gram-negative-bacilli/legionella-infection>.(22 juin 2024).

### (C)

**Cabanes, P. A., Dubrou, S., Larguier, M., Saude, I., Festy, B. (1995).** Les *Legionella* dans l'environnement hydrique sanitaire. *Médecine et Maladies Infectieuses*, (6),850-7.

**Cattan, S., Thizy, G., Michon, A., Arlet, J.B., Lanternier, F., Lebeaux, D. et al. (2019).** Actualités sur les infections à *Legionella*. *La Revue de Médecine Interne*, 40(12),791-8.

**Chauhan, D., Shames, S.R. (2021).** Pathogenicity and Virulence of *Legionella*: Intracellular replication and host response. *Virulence*, 12(1),1122-1144.

**Cianciotto, N.P. (2001).** Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol*, (5),331-43.

**Cocuzza, C.E., Martinelli, M., Perdoni, F., Giubbi, C., Vinetti, M.E.A., Calaresu, E. et al. (2021).** Antibiotic Susceptibility of Environmental *Legionella pneumophila* Strains Isolated in Northern Italy. *Int J Environ Res Public Health*,18(17),9352.

## Référence bibliographique

---

### (D)

**Descours, G. (2013).** Legionella pneumophila et macrolides : de l'antibiogramme à la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance. Thèse de doctorat bactériologie. Ecole doctorale « Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation ». Université Claude Bernard, Lyon.p179.

### (E)

**Eucast. (2021):** Legionella AST - guidance updated [Internet]. [Disponible sur :[https://www.eucast.org/eucast\\_news/news\\_singleview?tx\\_ttnews%5Btt\\_news%5D=436&cHash=8b0a5c767da917207a28f8f9c864d2f6](https://www.eucast.org/eucast_news/news_singleview?tx_ttnews%5Btt_news%5D=436&cHash=8b0a5c767da917207a28f8f9c864d2f6)].

### (F)

**Faulkner, G., Garduño, R.A. (2002).** Ultrastructural analysis of differentiation in Legionella pneumophila. J Bacteriol,184(24),7025-7041.

**Ferran, A. (2009).** Impact de l'administration précoce d'une fluoroquinolone sur l'éradication bactérienne et sur la sélection de résistances : approche PK/PD in vitro et in vivo. Thèse de doctorat en pharmacologie.Université paul sabatier. Toulouse3. p151.

**Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E. (2002).** Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev, 15(3),506-26.

**Fu, K.P., Neu, H.C. (1979).** Inactivation of beta-lactam antibiotics by Legionella pneumophila. Antimicrob Agents Chemother, 16(5),561-564.

### (G)

**Garduño, R.A., Garduño, E., Hoffman, P.S. (1998).** Surface-Associated Hsp60 Chaperonin of Legionella pneumophila Mediates Invasion in a HeLa Cell Model. Orndorff PE, éditeur. Infect Immun, 66(10),4602-4610.

### (H)

**Harper, G.J et Morton, J.D. (1953).** The respiratory retention of bacterial aerosols: experiments with radioactive spores. J Hyg (Lond), 51(3),372-385

## Référence bibliographique

---

### (K)

**Keše, D., Obreza, A., Rojko, T., Kišek, T.C. (2021).** Legionella pneumophila—Epidemiology and Characterization of Clinical Isolates, Slovenia, 2006–2020. *Diagnostics*, 11(7),1201.

**Khaledi, A., Bahrami, A., Nabizadeh, E., Amini, Y., Esmaeili, D. (2018).** Prevalence of Legionella Species in Water Resources of Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iran J Med Sci*,43(6),571 80.

### (L)

**Ludwig, B., Rahfeld, J., Schmidt, B., Mann, K., Wintermeyer, E., Fischer, G., et al. (1994).** Characterization of Mip proteins of Legionella pneumophila. *FEMS Microbiol Lett*,118(1-2),23-30.

### (M)

**Manske, C., Hilbi, H. (2014).** Metabolism of the vacuolar pathogen Legionella and implications for virulence. *Front Cell Infect Microbiol*, 4,125.

**Martin, E.C. (2020).** Identification des micro-organismes pathogènes par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale. Planet-Vie. Disponible sur: <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/identification-des-micro-organismes-pathogenes-par>.

**Massip, C., Descours, G., Ginevra, C., Doublet, P., Jarraud, S., Gilbert, C. (2017)** Macrolide resistance in Legionella pneumophila: the role of LpeAB efflux pump. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(5),1327-1333.

**Ministère de la santé et de la prévention française.** CSHPF, guide « Gestion du risque lié aux légionelles » publié en 2002.

**Ministère de la santé et de la prévention française.** Circulaire du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé.

**Ministère de la santé et de la prévention française.** Circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux.

## Référence bibliographique

---

**Ministère de la santé et de la prévention française.** Circulaire du 08/12/05 relative à l'application des arrêtés ministériels du 13 décembre 2004 relatifs aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air.

**Ministère de la santé et de la prévention française.** Circulaire du 08/12/05 relative à l'application des arrêtés ministériels du 13 décembre 2004 relatifs aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air (rubrique 2921).

**Ministère de la santé et de la prévention française.** Arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire <https://www.legifrance.gouv.fr/>

**Moliner, C., Ginevra, C., Jarraud, S., Flaudrops, C., Bedotto, M., Couderc, C. et al. (2010).** Rapid identification of Legionella species by mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology*,59(3),273 -284.

### (N)

**Natås, O.B., Brekken, A.L., Bernhoff, E., Hetland, M.A.K., Löhr, I.H., Lindemann, P.C. (2019).** Susceptibility of Legionella pneumophila to antimicrobial agents and the presence of the efflux pump LpeAB. *J Antimicrob Chemother*,74(6),1545-1550.

**Nisar, M.A., Ros, K.E., Brown, M.H., Bentham, R., Best, G., Xi, J. et al. (2023).** Stagnation arising through intermittent usage is associated with increased viable but non culturable Legionella and amoeba hosts in a hospital water system. *Front Cell Infect Microbiol*, 13:1190631.

### (O)

**Okunaga, M., Kushiro, K., Horie, R., Kondo, A., Abe, T. (2022).** Identification of microbes coexisting with Legionella spp. in bathwaters. *npj Clean Water*,5(1),1-8.

### (P)

**Palusinska-Szyszl, M., Luchowski, R., Gruszecki, W.I., Choma, A., Szuster-Ciesielska, A., Lück, C., et al. (2019).** The Role of Legionella pneumophila Serogroup 1 Lipopolysaccharide in Host-Pathogen Interaction. *Front Microbiol*,10,2890.

## Référence bibliographique

---

**Pedro-Botet, M.L et Yu, V.L. (2009).** Treatment strategies for Legionella infection. Expert Opinion on Pharmacotherapy,10(7),1109-21.

**Petzold, M., Thürmer, A., Menzel, S., Mouton, J.W., Heuner, K., Lück, C. (2013).** A structural comparison of lipopolysaccharide biosynthesis loci of Legionella pneumophila serogroup 1 strains. BMC Microbiol,13,198.

**Philippe, C., Blech, M.F., Hartemann, P. (2006).** Multiplication intra-amibienne de *Legionella pneumophila* et rôle potentiel des amibes dans la transmission de la légionellose. Médecine et Maladies Infectieuses,36(4),196-200.

**Pocidalò, J.J. (1993).** Activité de l'acide clavulanique vis-à-vis de Legionella pneumophila. Médecine et Maladies Infectieuses,23,73 -81.

(S)

**Sandalakis, V., Chochlakis, D., Goniòtakis, I., Tselentis, Y., Psaroulaki, A. (2014).** Minimum inhibitory concentration distribution in environmental Legionella spp. isolates. Journal of Water and Health,12(4),678 -685.

**Schoen, M. E. et Ashbolt, N. J. (2011).** An in-premise model for Legionella exposure during showering events. Water research, 45, 5826-36.

**Seck, A., Dia, M., Garin, B., Deguenovo, L. F., Ndiaye, P. I., Seck, L.B., Seye, M.N., Kone, M., Bercion, R., Bouh Boye, C.S., Sow, A.G. (2016).** Evaluation du niveau de contamination par les legionelles du réseau de distribution d'eau des établissements hospitaliers et hôteliers à Dakar, Senegal. Revue Africaine et Malgache de Recherche Scientifique/Sciences de la Santé, 4(1).

**Shadoud, L. (2014).** Approches moléculaires de l'épidémiologie de la légionellose et de la résistance aux antibiotiques chez Legionella pneumophila. thèse de doctorat en Sciences du Vivant, École doctorale chimie et science du vivant, Université de Grenoble, France .p196.

**Steinert, M., Hentschel, U., Hacker, J. (2002).** Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray. FEMS Microbiol Rev, 26(2),149-162.

## Référence bibliographique

---

**Stone, B.J et Kwaik, Y.A. (1999).** Natural Competence for DNA Transformation by *Legionella pneumophila* and Its Association with Expression of Type IV Pili. *J Bacteriol*,181(5),1395-402.

(T)

**Thomas, V. (2004).** Ecologie de *Legionella pneumophila* dans les réseaux de distribution d'eau potable. Thèse de doctorat en Sciences du Vivant, École doctorale Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué, Université Paris Sud, France, p354.

**Toni, A., Touron-Bodilis, A., Wallet, F. (2009).** Effet du changement climatique sur les micro-organismes aquatiques pathogènes : quelques exemples. *Environnement, Risques & Santé*, 8(4),311-321.

(V)

**Viasus, D., Gaia, V., Manzur-Barbur, C., Carratalà, J. (2022).** Legionnaires' Disease: Update on Diagnosis and Treatment. *Infect Dis Ther*,11(3),973-986.

(W)

**Winn, WC. (1996).** -*Legionella*,*MEDICAL MICROBIOLOGY*,Galveston Texas, 4th edition éditeur Baron S,40-100.

(Y)

**Yeterian, E.C. (2010).** Bases moléculaires de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*.Thèse de doctorat en Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie,université de Strasbourg,France,p178.

# *Annexe*

## Annexe I

Tableau II : Différent espèces et sérogroupes de légionelles

<b>Espèces de <i>Legionella</i></b>	<b>Sérogroupe</b>	<b>Association avec des cas cliniques</b>
<i>L. gratiana</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. gresslenis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. hackeliae</i>	2	Oui
<i>L. israelensis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. jamestowniensis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. jordans</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. lansingensis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. londiniensis</i>	2	Inconnu
<i>L. longbeachae</i>	2	Oui
<i>L. lytica</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. maceachernii</i>	Inconnu	Oui
<i>L. micdadei</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. moravica</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. nautarum</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. oakridgensis</i>	Inconnu	Oui
<i>L. parisiensis</i>	Inconnu	Oui
<i>L. pneumophila</i>	16	Oui
<i>L. quateirensis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. quinlivanii</i>	2	Inconnu
<i>L. rowbothamii</i>	Inconnu	Inconnu

<i>L. rubrilucens</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. sainthelensii</i>	2	Oui
<i>L. santriensis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. shakespearei</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. spiritensis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. steigerwaltii</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. tusconensis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. wadsworthii</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. waltersii</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. adelaidensis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. anisa</i>	Inconnu	Oui
<i>L. beliardensis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L.birminghamensis</i>	Inconnu	Oui
<i>L. bozemanii</i>	2	Oui
<i>L. brunensis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. busanensis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. cherrii</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. cincinnatiensis</i>	Inconnu	Oui
<i>L. drozanskii</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. dumoffii</i>	Inconnu	Oui
<i>L. drancourtii</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. erythra</i>	2	Oui
<i>L. fairfieldensis</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. fallonii</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. feeleii</i>	Inconnu	Oui

<i>L. geestiana</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. genomospecies 1</i>	Inconnu	Inconnu
<i>L. gormanii</i>	Inconnu	Oui

(Bartram et al., 2007)

**Tableau IV :** Différentes formes pathogène causées par les Légionnelle

Maladie des légionnaires	Fièvre de Pontiac	Forme extra-pulmonaire
<p>Symptômes : après 2 à 10 jour d'incubation : fièvre, malaise générale, céphalée, toux sèche sans signe rhinopharyngés, douleur thoracique</p> <p>Forme grave : une insuffisance respiratoire + lésion pulmonaire parfois insuffisance rénale aigu avec anurie</p>	<p>Symptômes : incubation courte environ 48heure</p> <p>Infection aiguë des voie respiratoires supérieurs avec signe neurologique (céphalée, vertiges, trouble de conscience)</p>	<p>Personne immunodéprimée</p> <p>Symptômes : il existe trois manifestations :</p> <p>Manifestation extra pulmonaire</p> <p>Forme nosocomiale avec porte d'entrée d'origine chirurgicale souillée par de l'eau content <i>Legionella</i></p>

(Bush et Vazquez-Pertejo, 2024 ; Bouvet, 2006)

## Milieux de culture et compositions

Selon la norme ISO 11731/2017, il existe plusieurs milieux pour isoler les légionnelles

## Composition

- ✚ Géluse tamponnée au charbon actif et a l'extrait de levure (BCYE)

<b>Extrait de levure</b>	<b>10,0g</b>
<b>Gélose</b>	<b>12,0g</b>
<b>Charbon actif</b>	<b>2,0g</b>
<b><math>\alpha</math>-cétoglutarate, sel monopotassique</b>	<b>1,0g</b>
<b>Tampon ACES(acide N-2-acétamido-2-aminoéthanesulfonique)</b>	<b>10,0g</b>
<b>Hydroxyde de potassium(KOH)(pastilles)</b>	<b>2,8g</b>
<b>Chlorhydrate de L-cystéine monohydraté</b>	<b>0,4g</b>
<b>Pyrophosphate de fer (III)</b>	<b>0,25g</b>
<b>Eau</b>	<b>1000ml</b>

### Milieu de culture sélectifs (BCYE+AB)

Les concentrations finales des suppléments sélectifs dans la gélose BCYE+AB doivent être :

<b>Sulfate de polymyxine B</b>	<b>80000UI/l</b>
<b>Céfazoline sodique</b>	<b>0,009g/l</b>
<b>Pimaricine</b>	<b>0,07g/l</b>

**Note** Ce milieu de culture est identique à la gélose BCYE, sauf que trois suppléments antibiotiques sont ajoutés à la gélose BCYE.

### Milieu de culture fortement sélectif : gélose à base de glycine, vancomycine, polymyxine B et cycloheximide (GVPC)

Les concentrations finales des suppléments sélectifs dans la gélose GVPC doivent être

<b>Glycine exempte d'ammonium</b>	<b>3g/l</b>
<b>Sulfate de polymyxine B</b>	<b>80000UI/l</b>
<b>Chlorohydrate de vancomycine</b>	<b>0,001g/l</b>
<b>Cycloheximide</b>	<b>0,08g/l</b>

**Note** ce milieu de culture est identique à la gélose BCYE, sauf que trois suppléments antibiotiques sont ajoutés à la gélose BCYE.

**✚ Milieu de culture fortement sélectif : gélose de Wadowsky et Yee modifiée (MWY)**

Les concentrations finales des suppléments sélectifs dans la gélose MWY doivent être :

<b>Glycine exempte d'ammonium</b>	<b>3g/l</b>
<b>Sulfate de polymyxine B</b>	<b>50000UI/l</b>
<b>Chlorohydrate de vancomycine</b>	<b>0,001g/l</b>
<b>Anisomycine</b>	<b>0,08g/l</b>
<b>Bleu de bromothymol</b>	<b>0,01g/l</b>
<b>Bromocrésol pourpre</b>	<b>0,01g/l</b>

**Note** Ce milieu de culture est identique à la gélose BCYE, sauf que trois suppléments antibiotiques, deux indicateurs et de la glycine sont ajoutés à la gélose BCYE.

## Annexe

---

### Gélose au sang

<b>Gélose</b>	<b>15,0g</b>
<b>Substrat nutritif (extrait de cœur et peptones)</b>	<b>20,0g</b>
<b>Chlorure de sodium</b>	<b>5,0g</b>
<b>Sang (de cheval ou de mouton, par exemple)</b>	<b>50ml</b>
<b>Eau</b>	<b>1000ml</b>

### Gélose TSA

<b>Digestion enzymatique de caséine</b>	<b>15,0g</b>
<b>Digestion enzymatique de soja ou de tourteau de soja</b>	<b>5,0g</b>
<b>Chlorure de sodium</b>	<b>5,0g</b>
<b>Gélose</b>	<b>15,0g</b>
<b>Eau</b>	<b>1000ml</b>

## Annexe II

### ✚ Matériel utilisée

#### ✓ Matériel non biologique

Bécher 50ml

Portoir

Flacon d'échantillon 1L

Désinfectant (sanitizer)

Flacon en verre pour préparation de milieu 500ml

Barreau magnétique

Plaque de métal (type zybio)

Lame et lamelle

Entonnoir en verre

Entonnoir en métal

Jarre scellé

Éprouvette 1000cm<sup>3</sup>

Bécher 600ml

Pipettes pasteurs

Tubes à vis

Tubes de conservation

Eau physiologique 10ml

Eau distillée 250ml

Spatule

Pipettes de 1 ml

Pipettes de 5ml

Micropipette 1000ul

Micropipette 0.5-10ul

Pipeteur

Étaler en « L » stérile

Filtres 0.45um

Test d'agglutination pour légionelles (**Oxoid**)

Sachets GEN bag (**pour conservation**)

Anse de platine

Pipette graduée

Bandelette imprégnée d'antibiotique E test (Ciprofloxacine CI, Ampicilline)

AMP, Amoxicilline +Acide Clavulanique (XL))

Pince

Embouts

Boîtes de pétries

## ✚ Milieux et produit chimique utilisée

KOH (protocole de préparation), KCL (protocole de préparation), solution acide (A+B) (protocole de préparation), glycérol 20%, bouillon BHIB (Bouillon Heart Infusion de Cerveau), Alcool, produit pour coloration (la fuschine, bleu de méthylène, lugol , violet de gentiane, huile a émersion).

## ✚ Dispositifs de laboratoire

Rampe de filtration +pompe (EZ-Stream), vortex (Fisher bioblock scientific), agitateur avec plaque chauffante, MALDI-TOF EXS 2600, étuve à 37+1 °C, étuve à 40°C, bain marie à 50 °C, Balance électronique, Bec benzène, pH mètre (Seven Excellence), microscope a écran LCD

## ✓ Matériel biologique

Souche de référence *Legionella pneumophila* (ATCC3315)

Souche (387 2018)



Filtre (0.45um)



pH mètre (Seven Excellence)



Balance électronique



Rampe de filtration accompagnée avec des échantillons de légionelles

### Protocole de préparation pour KOH

**But :** Le but de préparer une solution de KOH (hydroxyde de potassium) pour maintenir le pH d'un milieu de culture est principalement lié à son efficacité comme base forte pour ajuster et stabiliser le pH.

Portez des équipements de protection individuelle (gants, lunettes)



Préparez les matériaux nécessaires : KOH solide, eau distillée, bécher, agitateur



Calculez la quantité nécessaire de KOH pour préparer 2N solution (112.22g dans 1 litre)



Mesurez 112.22 g de KOH et placez-la dans un bécher propre



Ajoutez lentement 1 litre d'eau distillée tout en agitant continuellement



Laissez refroidir la solution si nécessaire



Vérifiez le pH de la solution avec un pH-mètre



Si nécessaire, ajustez le pH en ajoutant KOH ou de l'eau distillée



Transférez la solution dans un flacon propre et étiqueté

### Protocole pour préparation de KCL

**But :** Le chlorure de potassium (KCl) est couramment utilisé dans les pH-mètres, principalement pour l'entretien et le stockage des électrodes de pH.

Portez des équipements de protection individuelle (gants, lunettes)



Préparez les matériaux nécessaires : KCl solide, eau distillée, bécher, agitateur



Calculez la quantité nécessaire de KCl pour préparer 3N de la solution (55.91g dans 250 ml)



Mesurez 55.91g de KCl et placez-la dans un bécher propre



Ajoutez lentement 250 ml de l'eau distillée au KCl en agitant continuellement



Laissez refroidir la solution si nécessaire



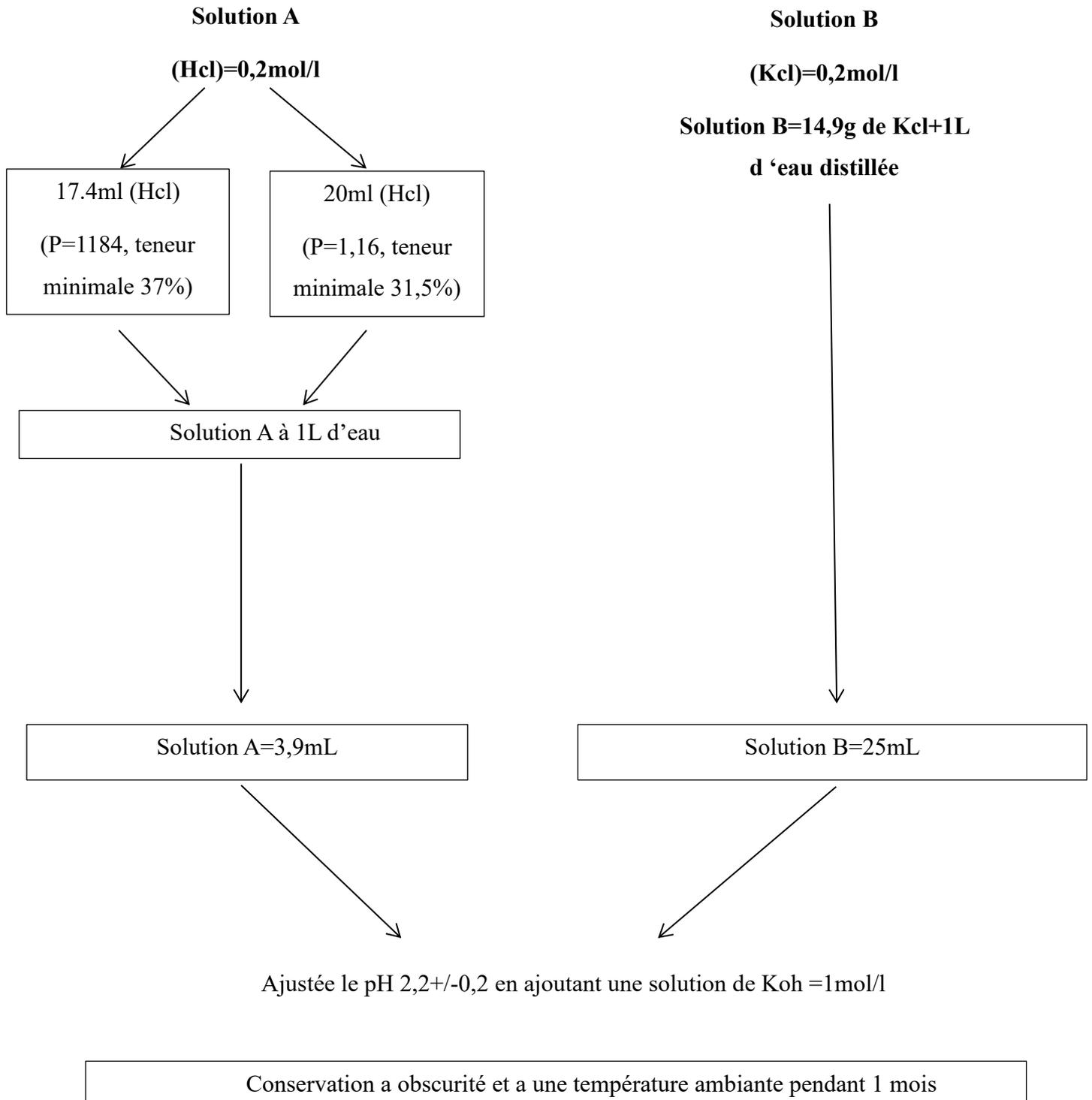
Vérifiez la concentration de la solution avec un pH-mètre ou une balance



Transférez la solution dans un flacon propre et étiqueté

## Préparation d'une solution Acide (A+B)

**But :** utilisée cette dernière dans le traitement acide pour la purification de l'échantillon des résidus de milieux extérieur.



## ✚ Milieu de culture utilisée pour isolement et identification de légionelles



Base CM1203



Base CM0655

- ✓ Buffer ACES (acide N-2-acétamido-2-aminoéthanesulfonique)
- ✓ 500g → 13.7l
- ✓ Charbon actif 2g
- ✓ Extrait de levure 10g
- ✓ Agar 14g/l
- ✓ Acide cétylglutarique 0.5g/l
- ✓ Ajuster avec 8.8ml de KOH 2N

- ✓ Absence
- ✓ 500g → 20litre
- ✓ Charbon actif 2g
- ✓ Extrait de levure 10g/l
- ✓ Agar 13g
- ✓ Absence
- ✓ Pas de précision pour le KOH dans le milieu

## ✚ Additif pour les deux bases utiliser

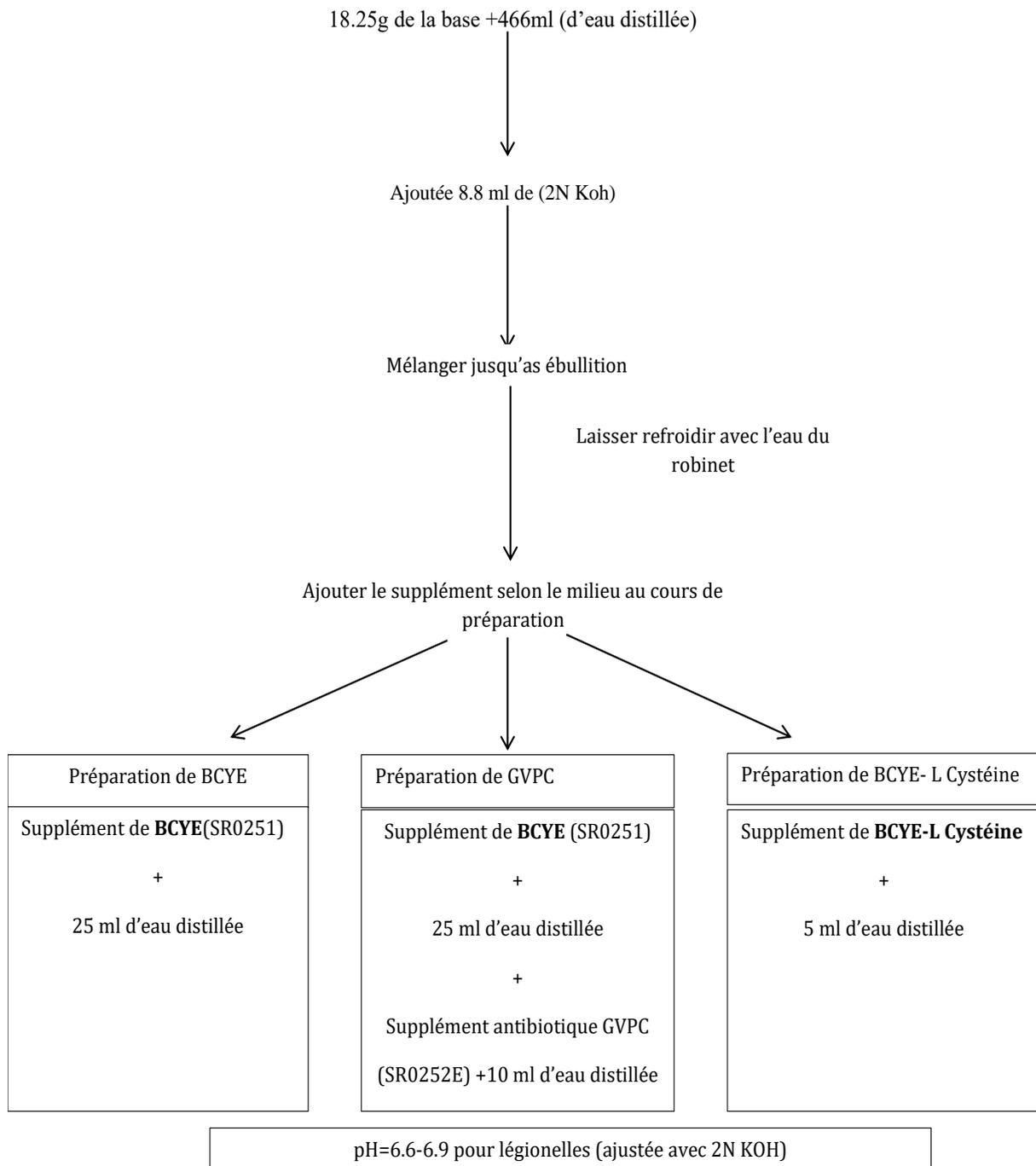
Pour préparation des milieux BCYE et GVPC on ajoute les additifs suivant aux base préalablement préparée (protocole de préparation de milieu de culture pour légionelles) :

- *Legionella* Growth Supplement SR0251C (BCYE)
- *Legionella* Selective Supplement SR0252E(GVPC)
- *Legionella* Growth Supplement SR0253A (BCYE Without L-cysteine)

## Protocole de préparation des milieux de culture pour la recherche de légionelles

La base du milieu la plus utilisée est CM1203 : En raison de rendement et le pH qui est bien précisé

### Préparation de la base (Légionella agar base CM1203)





Préparation de milieu de culture pour l'isolement et l'identification des légionelles

## Annexe III

Protocole pour coloration de gram /état frais

### Coloration de Gram

#### 1. Préparation de l'Échantillon

Étalez l'échantillon sur une lame et fixez-le par la chaleur.

#### 2. Cristal Violet (1 min)

Ajoutez quelques gouttes de cristal violet, puis rincez.

#### 3. Lugol (1 min)

Ajoutez quelques gouttes de Lugol, puis rincez.

#### 4. Décoloration (Alcool) (10-30 sec)

Appliquez de l'alcool, puis rincez immédiatement.

#### 5. Observation au Microscope

Observation de bacilles Gram-négatives (roses)

**(Legionella)**

### Coloration par bleu de méthylène (état

#### 1. Préparation de l'Échantillon

Déposez l'échantillon sur une lame propre.

#### 2. Ajout de Solution Physiologique (NaCl 0,9 %)

Ajoutez une goutte de solution physiologique pour diluer l'échantillon.

#### 3. Bleu de Méthylène (Optionnel)

Ajoutez une goutte de bleu de méthylène pour colorer l'échantillon (optionnel).

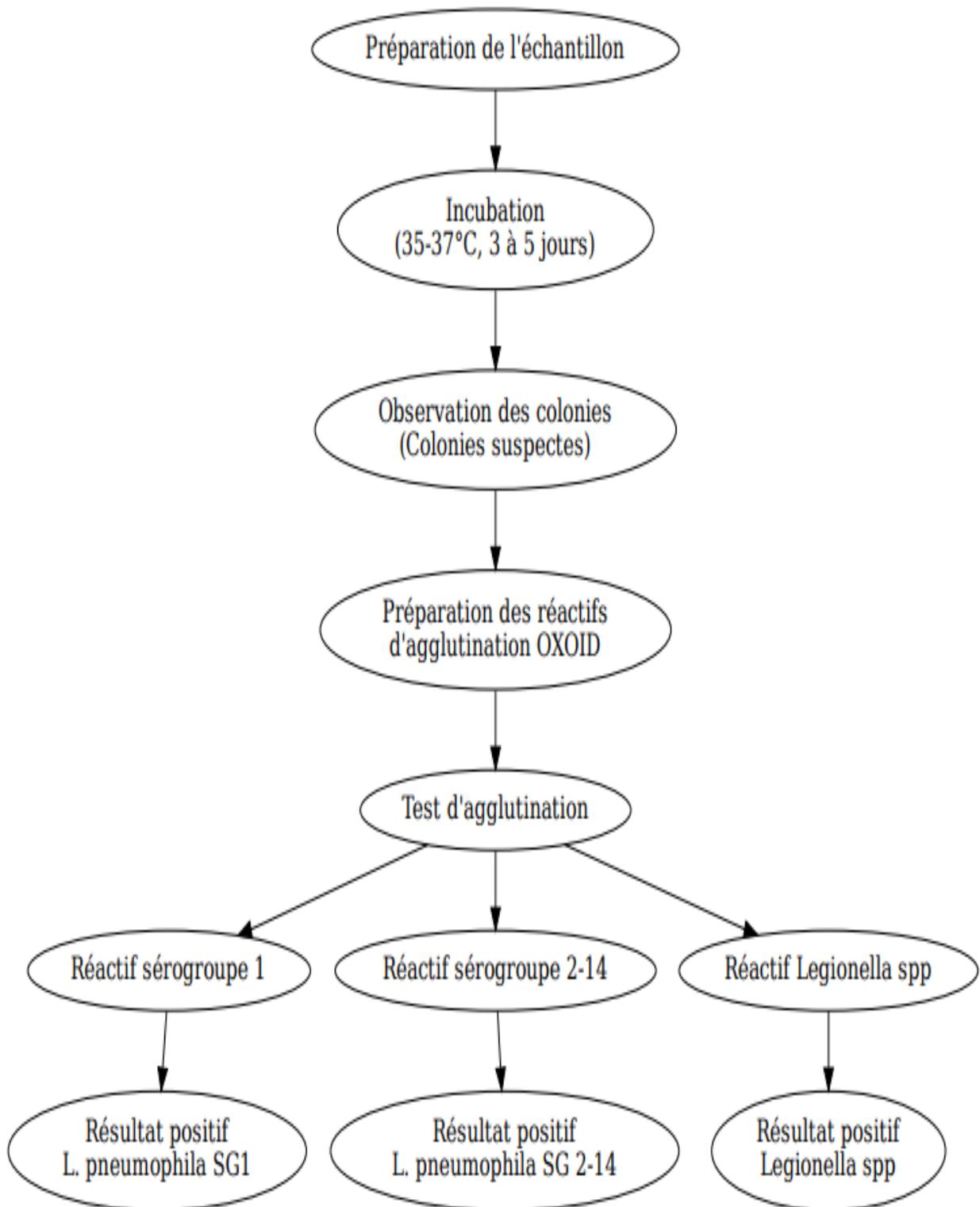
#### 4. Montage de la Lamelle

Placez une lamelle sur la goutte, évitez les bulles d'air.

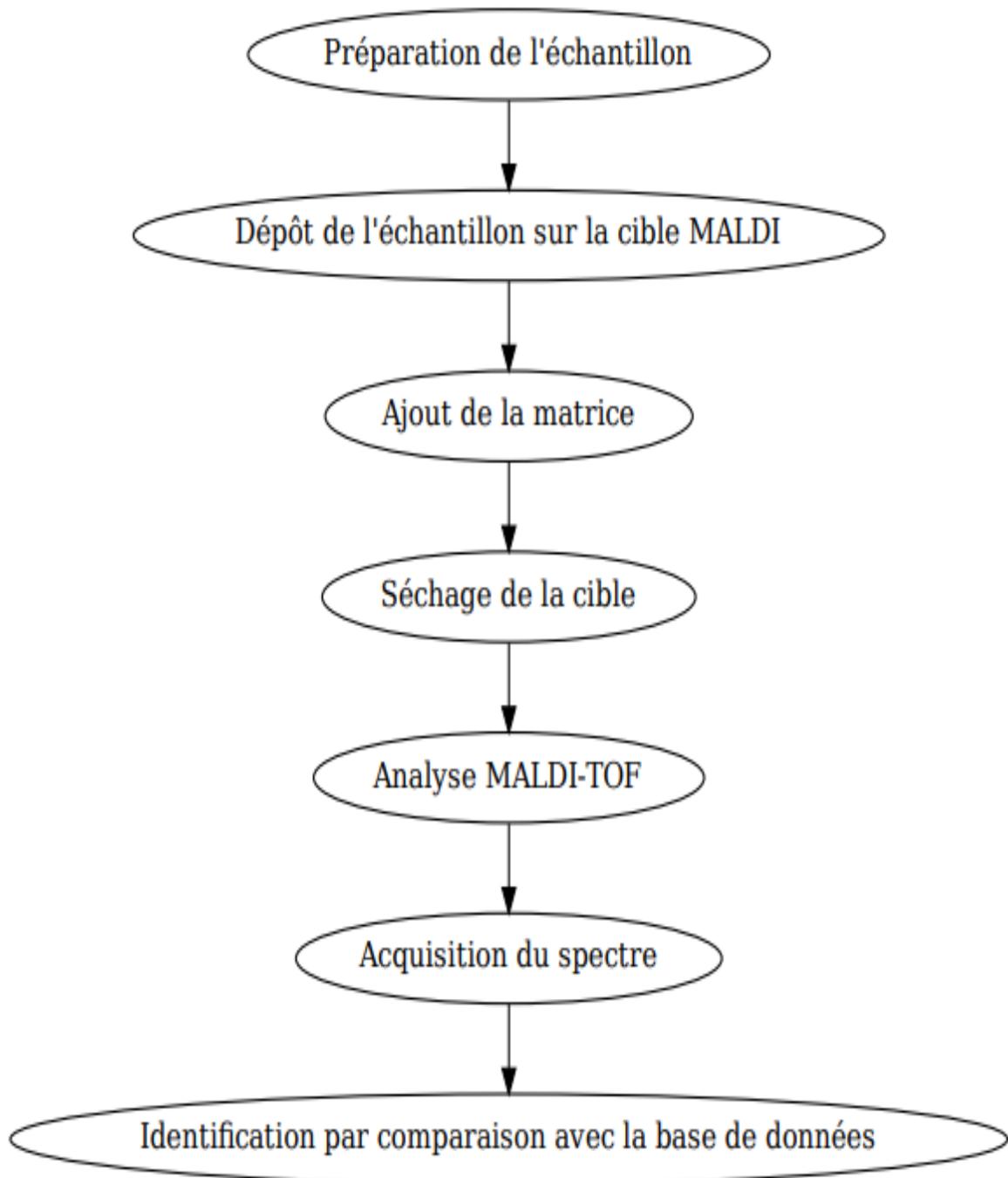
#### 5. Observation au Microscope

Observation de bacilles qui ont des mouvements par twitching **(Legionella)**

## ✚ Protocole pour test d'agglutination (Oxoid)



### ✚ Protocole pour identification taxonomique par MALDI-TOF EXS2600



## Annexe IV

### ✚ Protocole pour déterminer la CMI des différentes souches de légionelles sur milieu solide par Etest

**Objectif :** Déterminer le niveau de sensibilité aux antibiotiques des souches environnementales de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 et *Legionella pneumophila* séro groupe 2-14, *Legionella spp* et *Legionella pneumophila* ATCC 3315.

Une suspension d'inoculum chargée (1.2 McFarland)



Tremper un écouvillon stérile dans la suspension de l'inoculum



Laisser l'excès d'humidité être absorbé de sorte que la surface soit complètement sèche (15-20minutes)



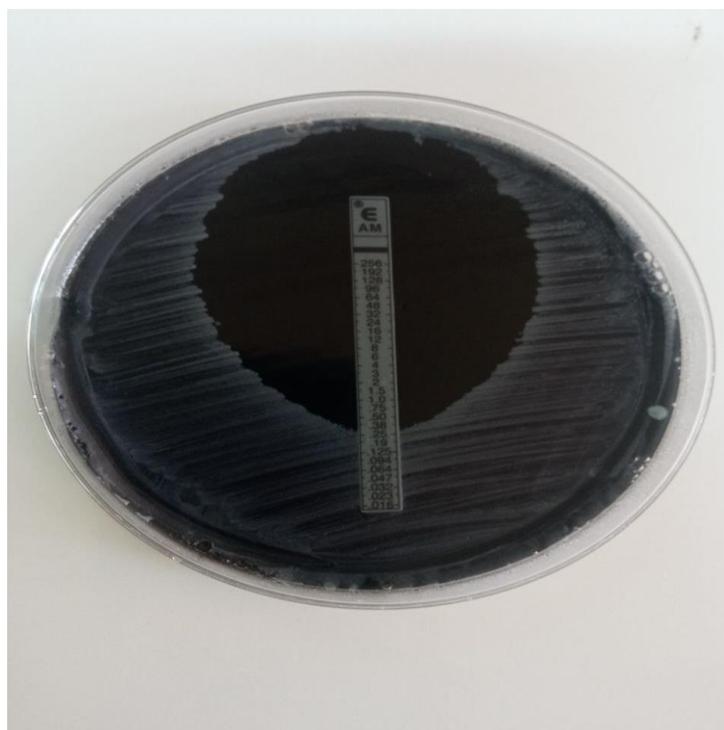
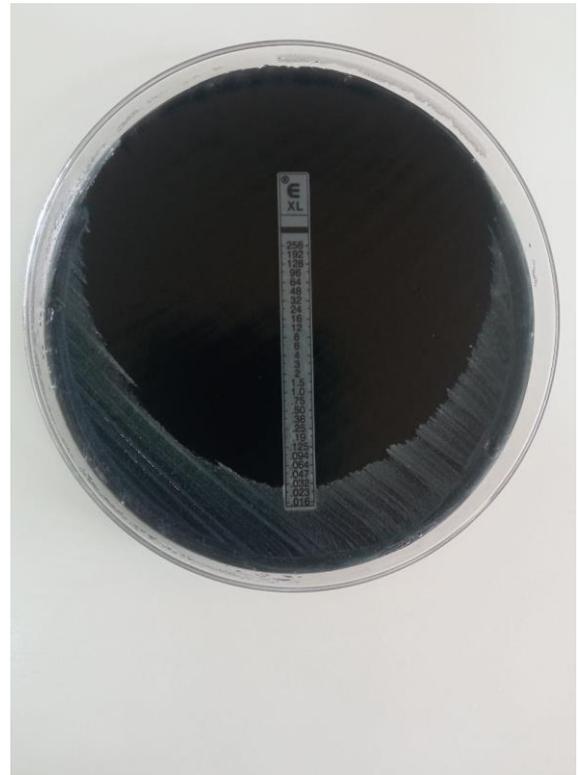
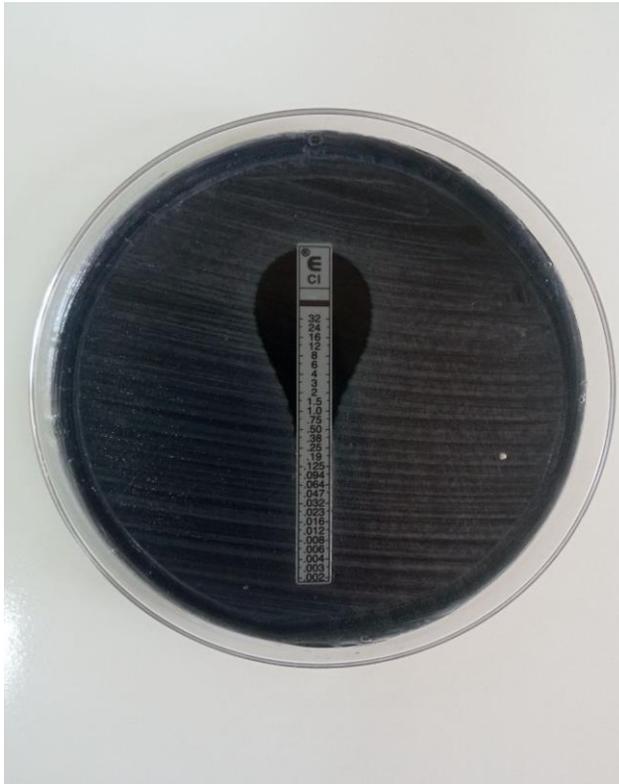
Appliquer la bandelette sur la surface de la gélose avec l'échelle vers le haut et le code de la bandelette vers l'extérieur de la plaque qui contient les antibiotiques : Ciprofloxacine (CI), Amoxicilline + acide clavulanique (XL), Ampicilline (AMP)



Incubé à 35+/-2°C pendant 48H (CO2 2,5 en condition d'humidité) ou bien 72H selon la concentration d'antibiotiques

## Annexe

✚ Quelques résultats d'antibiogrammes pour les souches de légionelles :



Différents résultats pour E test sur une souche sauvage de *Legionella pneumophila*

✚ La conservation des produits chimiques et des souches se fait dans la chambre froide



Chambre froide

**(Annexe V)**

**Tableau VIII : Répartition des légionelles selon la région**

La région	Absence	Présence
Adrar	2	0
Alger	29	2
Canstantine	4	4
Hassi Massoud	6	0
Oran	4	1
Skikda	4	1
Tlemcen	6	0

**Tableau IX : Répartition des légionelles selon l'origine du prélèvement**

L'origine	Absence	Présence
Adoucisseur	1	0
Ballon d'eau chaude	4	1
Cuisine centrale	4	0
Cumulus	3	0
Douche	13	0
Lavabo	3	1
Mélangeur CIF	7	5
Piscine	1	0
Robient mixte	17	0
Vestiaire	2	1

**Tableau X : Analyse Descriptive de l'Impact de la Température sur la Présence et l'Absence de Légionelles**

Résultat		Statistiques		Erreur standard
Température °C	Absence	Moyenne	40,5356	1,51423
		Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne	37,4998	
		Borne inférieure	43,5715	
		Borne supérieure	40,5215	
		Moyenne tronquée à 5 %	40,0000	
		Médiane	126,109	
		Variance	11,22984	
		Ecart type	20,00	
		Minimum	61,00	
		Maximum	41,00	
	Plage	16,00		
	Plage interquartile	-,075	,322	
	Asymétrie	-,810	,634	
	Kurtosis	48,2500	2,12762	
	Présenc	Moyenne	43,2190	
		Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne	53,2810	
		Borne inférieure	47,9444	
		Borne supérieure	46,5000	
		Moyenne tronquée à 5 %	36,214	
		Médiane	6,01783	
Variance		41,00		
Ecart type		61,00		
Minimum		20,00		
Maximum		5,75	,752	
Plage	1,430	1,481		
Plage interquartile	2,814			
Asymétrie				
Kurtosis				

