



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par
l'Université Toulouse III – Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Ingénieries Microbienne et Enzymatique

Présentée et soutenue par Sophie PECASTAINGS
Le 17 novembre 2010

Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles

JURY

Rapporteurs :	Mme	Laurence MATHIEU (CNRS, Nancy)
	M.	Jean-Claude LAZZARONI (CNRS, Lyon)
Examineurs :	Mme	Céline OHAYON-COURTES (Université Bordeaux 2)
	Mme	Anne VIANNEY (Université Lyon I)
	M.	Fabien SQUINAZI (Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris)
Directrices de thèse :	Mme	Christine ROQUES (Université de Toulouse)
	Mme	Michèle CAPDEPUY (Université Bordeaux 1)

Ecole doctorale : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries
Unité de recherche : LU49, Adhésion bactérienne et formation de biofilms
Directrices de Thèse : Pr. Christine Roques & Pr. Michèle Capdepuy

Remerciements

Avant de présenter ce manuscrit, je tiens à signaler la participation, scientifique ou non, de toutes les personnes qui m'ont entourée.

En premier lieu, je remercie chaleureusement mes directrices de thèse : Michèle Capdepuy, d'abord, qui en plus d'avoir encadré cette première année de thèse, m'a fait découvrir le monde passionnant de la microbiologie en Licence. Je n'oublierai jamais mes premières observations de bacilles frétilants sous la lame ! Et bien sûr Christine Roques, qui m'a accueillie au sein du Laboratoire de Microbiologie Industrielle et m'a fait confiance tout au long de ces années. Merci de m'avoir permis d'évoluer dans cet environnement, en m'offrant l'opportunité de participer à de nombreux congrès et formations, ce qui n'est pas à la portée de tous les doctorants. Vos conseils et commentaires avisés, notamment lors de l'étape de rédaction de ce manuscrit, ont toujours été très enrichissants.

Je remercie Laurence Mathieu et Jean-Claude Lazzaroni de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail et d'en être rapporteurs. J'adresse également mes sincères remerciements à Anne Vianney pour s'être intéressée à ces travaux et avoir présidé son premier jury de thèse à l'occasion de cette soutenance. J'exprime également ma reconnaissance à Céline Ohayon-Courtès et Fabien Squinazi pour avoir examiné ce travail du point de vue de professionnels de l'hygiène des réseaux d'eau et du thermalisme. J'adresse à l'ensemble des membres du jury ma gratitude pour leurs conseils et commentaires judicieux lors de la soutenance, tant sur le plan fondamental qu'appliqué, et qui ont apporté à cette thèse qualité et précision.

Je remercie Mathieu Bergé pour m'avoir fait partager ses remarques sur ce travail, pour m'avoir aidée à répondre au 3^{ème} reviewer, mais aussi à remplir ces incompréhensibles tableaux de charges prévisionnelles d'enseignements !

Mes pensées vont aussi vers Cécile Pouzet de la plateforme de microscopie de l'IFR 40 de l'INRA de Auzeville. Merci de m'avoir formée à la microscopie confocale, mais aussi pour tes indispensables conseils sur les analyses d'images.

J'adresse une pensée particulière à Marie Deplanque, qui m'a tout appris des Légionnelles. Sans tes compétences et ton organisation, les essais sur pilote auraient été difficilement réalisables !

Remerciements

Je n'oublie pas non plus Jessica Amorim-Rioux et Lucie Wils, qui ont participé à ces travaux en tant que stagiaires, ni Laurence Degomme et Josy Chamayou pour leur soutien administratif mais aussi moral !

Mes remerciements vont bien sûr aux équipes qui m'ont accueillie pendant ces années de thèse.

À l'Institut du Thermalisme, merci au président, le Pr. Christian-François Roques et au directeur, le Pr. Jean Cambar, ainsi qu'à l'ensemble du personnel : Karine, Éric, Dorothee, Odile, Véronique, Sandra, Patrick, Christelle, Joël et Ghislaine.

Ensuite, merci à tout le personnel de la FONDEREPHAR : Cathy, Sabine, Haouaria, Laïla, Paméla, Jocelyne, Carole, Élisabeth, Sylvie, Sandra, Delphine, Ingrid, Cédric.

Enfin, je tiens à remercier mes collègues et amis du LabMI pour leur admirable soutien, leur enthousiasme et leurs encouragements : Christel, ma voisine de bureau toujours prête à rendre service, Amandine, collègue danseuse et « globe trotter » lors de quelques congrès, Julien, Aurélie, Audrey, Léïla, Pouneh, Alain.

Au moment de conclure cette thèse, je pense particulièrement à tous mes amis qui, de près ou de loin, m'ont toujours témoigné leur sympathie. Merci pour tous vos messages d'encouragement et votre présence réconfortante.

J'exprime toute ma reconnaissance à mes parents et mon frère qui m'ont soutenue au cours de ces nombreuses années d'études. Merci d'avoir cru en moi, souvent plus que moi-même !

Andrew, merci pour ton implication dans les nombreuses phases de ce travail (de la correction d'articles, aux répétitions de présentations, à la relecture...) mais surtout pour m'entourer d'autant d'affection. Merci à tes nombreuses attentions ces dernières semaines qui m'ont rendu la vie plus douce !

Un grand MERCI à vous tous sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour.

CHAPITRE I INTRODUCTION	9
CHAPITRE II SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	15
II.1 Thermalisme	17
II.1.1 Origine et définition	17
II.1.2 Orientations du thermalisme	19
II.2 Dangers microbiologiques liés à l'usage de l'eau minérale naturelle	25
II.2.1 Exposition et voies de contamination	26
II.2.1.1 Soins de catégorie 1	27
II.2.1.1.1 Étuves	27
II.2.1.1.2 Soins ORL	28
II.2.1.2 Soins de catégorie 2	28
II.2.1.3 Soins de catégorie 3	29
II.2.1.3.1 Douches	29
II.2.1.3.2 Baignoires	30
II.2.1.3.3 Piscines	30
II.2.1.4 Conclusion	31
II.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
II.2.2.1 Taxonomie et caractéristiques biologiques	34
II.2.2.2 Réservoirs	35
II.2.2.3 Risque infectieux et pouvoir pathogène	35
II.2.2.4 Facteurs de virulence	37
II.2.2.5 Sensibilité aux molécules antimicrobiennes	41
II.2.2.5.1 Antibiotiques	41
II.2.2.5.1 Désinfectants	42
II.2.3 <i>Legionella pneumophila</i>	45
II.2.3.1 Taxonomie et caractéristiques biologiques	45
II.2.3.2 Réservoirs	47
II.2.3.2.1 Interaction avec les amibes et cycle de réplication intracellulaire	48
II.2.3.2.2 Association avec le biofilm	51
II.2.3.3 Pathologie et risque infectieux	52
II.2.3.3.1 Pathologie	52
II.2.3.3.1 Épidémiologie de la maladie du Légionnaire	54
II.2.3.4 Facteurs de virulence	56
II.2.3.5 Sensibilité aux molécules antimicrobiennes	61

II.2.3.5.1	Antibiotiques	61
II.2.3.5.1	Désinfectants	62
II.2.4	Le biofilm	65
II.2.4.1	Définition	65
II.2.4.2	Étape d'adhésion	67
II.2.4.2.1	Mise en place du film conditionnant	68
II.2.4.2.2	Transfert des bactéries vers le support	68
II.2.4.2.3	Adhésion réversible	69
II.2.4.2.4	Adhésion irréversible	71
II.2.4.3	Prolifération et architecture du biofilm	72
II.2.4.3.1	Architecture du biofilm et technique d'analyse	73
II.2.4.3.2	Matrice d'exopolymères	75
II.2.4.3.2.1	Polysaccharides	75
II.2.4.3.2.2	Protéines - Adhésines	78
II.2.4.3.2.3	DNA	80
II.2.4.3.3	Quorum sensing	80
II.2.4.4	Détachement	82
II.3	Moyens de maîtrise de la qualité microbiologique de l'EMN dans les établissements thermaux	85
II.3.1	Actions sur la phase d'adhésion	85
II.3.1.1	Inhibition du transfert des bactéries vers leur support	85
II.3.1.2	Inhibition des phases d'adhésion réversibles et irréversibles	86
II.3.1.2.1	Impact des interactions électrostatiques	86
II.3.1.2.2	Impact de l'hydrophobicité	87
II.3.1.2.3	Impact de l'hydrodynamique	88
II.3.2	Inhibition de la prolifération du biofilm – détachement du biofilm formé	89
II.3.2.1	Maîtrise des conditions trophiques	89
II.3.2.2	Température	89
II.3.2.3	Nettoyage des réseaux de canalisations	90
II.3.2.4	Traitements de désinfection	92
II.3.2.4.1	Traitements utilisés en milieu thermal	92
II.3.2.4.2	Réglementation concernant les traitements de désinfection	96
CHAPITRE III	MATERIEL ET METHODES	99
III.1	Évaluation <i>in vitro</i> des protocoles de désinfection utilisés en milieu thermal sur <i>P. aeruginosa</i>	101
III.1.1	Souche utilisée	101
III.1.2	Désinfectants testés	101
III.1.3	Validation <i>in vitro</i> des protocoles de désinfection utilisés en milieu thermal	102
III.1.3.1	Évaluation de l'activité bactéricide sur cellules planctoniques	102
III.1.3.2	Évaluation de l'activité bactéricide sur biofilms à <i>P. aeruginosa</i>	104

III.1.3.3	Analyses statistiques	106
III.2	Essai <i>in situ</i> des protocoles de désinfection utilisés en milieu thermal, en utilisant un réseau-pilote	107
III.2.1	Réseau-pilote	107
III.2.1.1	Description du réseau et caractéristiques des types d'eau qui l'alimentent	107
III.2.1.2	Contamination artificielle du réseau-pilote	110
III.2.2	Prélèvements et analyses	111
III.2.2.1	Prélèvements	112
III.2.2.2	Analyses physico-chimiques de l'eau	112
III.2.2.3	Analyses microbiologiques de l'eau minérale naturelle	113
III.2.3	Protocoles de désinfection	115
III.2.3.1	Choc thermique	115
III.2.3.2	Choc chimique par le PHMB	115
III.2.4	Analyses statistiques	116
III.3	Évaluation de traitements de désinfection sur <i>L. pneumophila</i>	116
III.3.1	Souches bactériennes	116
III.3.2	Mise au point du modèle d'obtention de biofilms à <i>L. pneumophila</i> en microplaque	117
III.3.2.1	Sélection d'un milieu de culture adapté à la production de biofilm de <i>L. pneumophila</i>	117
III.3.2.2	Dénombrements des cellules adhérees	119
III.3.2.2.1	Dénombrements des cellules viables et cultivables	120
III.3.2.2.2	Analyses par PCR en temps réel	120
III.3.2.3	Caractérisation de la croissance de <i>L. pneumophila</i> en milieu liquide	122
III.3.2.4	Analyse de biofilms par observation en microscopie confocale	123
III.3.2.4.1	Marquages cellulaires	123
III.3.2.4.2	Marquage des carbohydrates de la matrice du biofilm	124
III.3.2.4.3	Aquisition d'images en microscopie confocale	124
III.3.2.4.4	Analyses d'images	125
III.3.2.5	Analyses statistiques	126
III.3.3	Évaluation <i>in vitro</i> de l'effet bactéricide à court et à moyen terme d'un choc thermique à 80 °C sur biofilms à <i>L. pneumophila</i>	126
III.4	Évaluation <i>in situ</i> de l'effet bactéricide à court et à moyen terme d'un choc thermique à 80 °C sur une contamination à <i>L. pneumophila</i>	127
III.4.1	Préparation de l'inoculum et inoculation du réseau-pilote	127
III.4.2	Prélèvements et analyses	128
III.4.3	Traitement de désinfection par choc thermique	128
CHAPITRE IV	VALIDATION DES PROTOCOLES UTILISES EN MILIEU THERMAL VIS-A-VIS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	129

IV.1	Introduction	131
IV.2	Validation de l'activité bactéricide des traitements de désinfection sur cellules en suspension	131
IV.2.1	Choc thermique	132
IV.2.2	Traitement biocide par le Chlore	133
IV.2.3	Traitement biocide par le Sanosil ®	135
IV.2.4	Traitement biocide par le Poly-HexaMéthylène Biguanide	136
IV.3	Validation in vitro des protocoles de désinfection utilisés en milieu thermal sur biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	138
IV.3.1	Choc thermique	139
IV.3.2	Traitement par le chlore	139
IV.3.3	Traitement par le Sanosil ®	140
IV.3.4	Traitement biocide par le PHMB	142
IV.4	Validation des traitements de désinfection sur réseau-pilote contaminé par <i>P. aeruginosa</i>	144
IV.4.1	Évolution naturelle de la flore du réseau-pilote	144
IV.4.2	Traitement par choc thermique	147
IV.4.3	Désinfection par le PHMB	149
IV.5	Discussion	152
IV.5.1	Modèle de formation de biofilm à <i>P. aeruginosa</i> en microplaque	152
IV.5.1.1	Conditions de croissance du biofilms à <i>P. aeruginosa</i> en microplaques	152
IV.5.1.2	Techniques de quantification des bactéries du biofilm	153
IV.5.2	Évaluation des traitements biocides	155
IV.5.2.1	Hypochlorite de sodium	155
IV.5.2.2	PHMB	158
IV.5.2.3	Sanosil ®	161
IV.5.2.4	Choc thermique	164
IV.6	Conclusion	166
 CHAPITRE V RÔLE DES BIOFILMS DANS LA RESISTANCE DE <i>L. PNEUMOPHILA</i> AU CHOC THERMIQUE		 169
V.1	Introduction	171
V.2	Mise au point d'un modèle de formation de biofilm monoespèce à <i>L. pneumophila</i> en microplaques	172
V.2.1	Mise au point et validation du modèle de base	172
V.2.2	Validation de la température de croissance optimale du biofilm à <i>L. pneumophila</i>	185
V.2.3	Caractérisation de la matrice du biofilm à <i>L. pneumophila</i>	187

V.3	Évaluation de l'activité du choc thermique sur <i>L. pneumophila</i>	191
V.3.1	Activité bactéricide in vitro du choc thermique sur biofilms à <i>L. pneumophila</i>	191
V.3.2	Évaluation in situ d'un choc thermique sur une contamination à <i>L. pneumophila</i> en réseau d'eau minérale naturelle	192
V.4	Discussion	196
V.4.1	Recherche de la température optimale pour la formation de biofilms en milieu SBB	196
V.4.2	Composition de la matrice du biofilm à <i>L. pneumophila</i> en milieu SBB	198
V.4.3	Essai de désinfection d'une contamination par <i>L. pneumophila</i> en réseau-pilote	199
V.5	Conclusion	202
CHAPITRE VI	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	203
CHAPITRE VII	BIBLIOGRAPHIE	209
CHAPITRE VIII	ANNEXES	235
VIII.1	Annexe 1 : liste des figures	237
VIII.2	Annexe 2 : liste des tableaux	240
VIII.3	Annexe 3 : liste des abréviations	241
VIII.4	Annexe 4 : composition des milieux de culture	243
VIII.5	Annexe 5 : liste des communications	249
VIII.6	Annexe 6 : publication	251

CHAPITRE I

Introduction

Chaque année, le thermalisme médical permet de traiter 500 000 personnes en France, pour soulager des affections de nature variée. Cette médecine est basée sur l'utilisation d'eau minérale naturelle, dont la composition physico-chimique particulière lui confère des propriétés favorables pour la santé. Compte tenu des pathologies qu'ils viennent traiter, l'état de santé des patients peut être variable et l'utilisation de l'eau minérale naturelle ne doit pas induire de risque secondaire pour leur santé. C'est la raison pour laquelle l'emploi des eaux minérales à des fins médicales est très réglementé. Le Ministère de la Santé impose notamment des analyses régulières au niveau des points d'usage où sont dispensés les soins thermaux. La réglementation vise à réduire la probabilité d'infections par des pathogènes opportunistes tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila*, deux des micro-organismes qui ne doivent être détectés en aucun point de l'établissement thermal.

Compte tenu de leur caractère naturel, les eaux minérales ne peuvent recevoir aucun traitement ou ajout de désinfectant résiduel (excepté une filtration ou un traitement aux UV au niveau des points d'usage), qui pourrait permettre de maîtriser la charge microbienne de l'eau (cas de l'eau d'adduction publique – EAP – potable). Pour éviter la détérioration de la qualité microbiologique de l'eau minérale naturelle, les exploitants thermaux doivent donc assurer une maintenance optimale de leurs réseaux afin de limiter les dépôts et de réduire la corrosion des canalisations, mais aussi de diminuer le risque de formation du biofilm, communauté de micro-organismes fixés sur les canalisations, à l'origine de la majeure partie de la contamination d'une eau. Des opérations de nettoyage et de désinfection sont donc régulièrement effectuées.

Malgré ces opérations de maintenance fréquentes, les gestionnaires d'établissements thermaux éprouvent des difficultés à maintenir des résultats d'analyses en accord avec la réglementation et sont en demande de produits et de méthodes de désinfection améliorés ou innovants. En effet, même si les biocides disponibles sur le marché font l'objet d'évaluations en terme d'activité bactéricide, l'analyse de la littérature scientifique fait souvent état d'un manque d'efficacité de certains traitements, notamment lorsqu'ils sont utilisés au sein même des réseaux.

L'objectif de cette thèse est donc d'évaluer les pouvoirs bactéricides de traitements de désinfection utilisés pour la désinfection de réseaux d'eau minérale naturelle, par plusieurs méthodes, afin d'évaluer l'efficacité potentielle *in situ*, en conditions réelles de traitement.

Ainsi trois méthodes de mesure du pouvoir bactéricide ont été sélectionnées :

- La méthode de référence, basée sur la norme NF EN 1040, qui permet de vérifier *in vitro* la bactéricidie d'un traitement sur des suspensions bactériennes ;
- Une méthode alternative, dérivée de la précédente mais appliquée sur biofilms mono-espèces obtenus *in vitro* en microplaques ;
- Une méthode d'évaluation en réseau-pilote alimenté en eau minérale naturelle et qui permet de se placer dans des conditions réelles de traitement, *in situ*.

La combinaison des deux premières méthodes avec des essais *in situ*, prenant en compte la spécificité des réseaux thermaux, a pour but de valider la pertinence des techniques *in vitro*.

Ces travaux ont porté sur deux bactéries problématiques au sein des réseaux thermaux, compte tenu de leur caractère pathogène potentiel et de leur lien étroit avec le biofilm : *P. aeruginosa* et *L. pneumophila*. Si, pour la bactérie *P. aeruginosa*, l'ensemble des méthodes citées étaient déjà décrites et utilisables, aucune méthode de formation de biofilms en microplaque, satisfaisant à nos objectifs de recherche, n'était disponible pour *L. pneumophila*. Par conséquent, la majeure partie des travaux concernant cette bactérie a consisté à la mise au point d'un tel modèle.

Ce manuscrit s'organise en sept chapitres, dont la présente introduction constitue le premier chapitre. Le chapitre II est une synthèse bibliographique qui présente l'enjeu du maintien d'une bonne qualité sanitaire de l'eau dans les établissements thermaux. Cette présentation nous permettra de déduire les principaux risques microbiologiques engendrés par l'usage d'eau minérale naturelle et de mieux comprendre le rôle du biofilm dans la contamination de cette eau. Enfin l'étude des moyens à disposition des exploitants thermaux pour maîtriser cette contamination sera effectuée. L'ensemble de cette synthèse bibliographique aboutira à l'exposé des objectifs de cette thèse.

Le chapitre III présente l'ensemble du matériel et des méthodes utilisés pour résoudre les objectifs de recherche fixés.

Les deux chapitres suivants présentent les résultats obtenus, suivis de discussions. Le chapitre IV concerne les essais réalisés sur la bactérie *P. aeruginosa* et la détermination des activités bactéricides de quatre traitements de désinfection. Le chapitre V décrit les essais qui ont été

réalisés sur la bactérie *L. pneumophila*. Cette partie expose notamment la description d'un modèle de formation de biofilm mono-espèce à *L. pneumophila in vitro* et inclue une publication parue dans le journal « Biofouling ».

Ces chapitres seront suivis d'une conclusion générale sur ces travaux de thèse et l'exposé des perspectives envisagées pour la suite du projet. Des annexes sont également proposées au lecteur afin de faciliter la compréhension du manuscrit ou d'en préciser certains aspects.

CHAPITRE II

Synthèse bibliographique

II.1 Thermalisme

II.1.1 Origine et définition

Les premières observations de l'effet bénéfique des Eaux Minérales Naturelles (EMN) datent de l'époque gréco-romaine. Plus particulièrement, Pline l'Ancien a décrit l'usage d'eaux de différentes natures pour le traitement de diverses affections : il préconisait notamment des eaux de sources sulfurées pour le traitement de faiblesses musculaires ou des eaux alcalines pour traiter la scrofule (inflammation des ganglions lymphatiques liée à une mauvaise nutrition). Tombés en désuétude au Moyen-Âge, l'intérêt des bains a été redécouvert en Europe à partir du 16^{ème} siècle, où de nombreuses cités se sont mises à exploiter leur ressource thermique : Bath au Royaume-Uni, Volterra ou Montecatini en Italie, Vichy en France (Routh *et al.*, 1996). A l'heure actuelle, les EMN sont exploitées pour la mise en bouteille mais également pour les cures thermales, essentiellement en Europe (France, Allemagne, Italie, Espagne...), en Asie (Japon, Corée (Hann, 1996)), ou en Amérique (États-Unis (Benedetto *et al.*, 1996)).

La France compte actuellement plus de 150 établissements thermaux (métropole et outre-mer), répartis essentiellement à l'est et au sud du pays (Figure II-1).



Figure II-1. Répartition des stations thermales en France – Conseil National des Exploitants Thermaux (CNETH, 2009).

En France, le thermalisme se définit par l'utilisation d'eaux minérales naturelles (EMN) à des fins thérapeutiques. Le décret du 9 juin 1989 définit une EMN comme « une eau se distinguant des autres eaux destinées à la consommation humaine par sa nature, caractérisée par sa teneur en minéraux et oligo-éléments (...) et sa pureté originelle » (Rocard *et al.*, 1989). Ainsi, une EMN se distingue d'autres types d'eau (d'adduction, de source) par sa composition physico-chimique spécifique, mais également par son origine souterraine profonde qui la protège des pollutions. Les EMN, dont les EMN à usage thérapeutique, ne peuvent ainsi subir

que des traitements « qui ne modifient pas la composition de cette eau dans ses constituants essentiels » (CSP, 2004).

Les eaux minérales naturelles peuvent être regroupées en cinq catégories principales :

- Les **eaux sulfurées** contiennent du soufre sous différents états d'oxydation (sulfures, polysulfures, soufre élémentaire) en fonction du pH de l'eau.
- Les **eaux sulfatées** sont issues du lessivage du gypse et contiennent, outre des sulfates, de fortes concentrations en calcium et magnésium.
- Les **eaux chlorurées sodiques** peuvent être fortement minéralisées (jusqu'à 350 g/L). C'est le cas à Salies-de-Béarn (64) où l'eau a pour origine la dissolution de sel gemme.
- Les **eaux bicarbonatées gazeuses** sont caractérisées par leurs concentrations en ions hydrogénocarbonate et en CO₂ sous forme libre, comme les eaux d'Auvergne.
- Les **eaux faiblement minéralisées**, pour finir, ont un extrait sec inférieur à 500 mg/L et ne présentent pas d'élément ionique prédominant. Toutefois, elles incluent les eaux oligo-métalliques, qui se distinguent par leurs concentrations en éléments traces comme le cuivre, le zinc, l'arsenic ou le sélénium.

Les eaux ferrugineuses ne constituent pas une catégorie à part entière, le fer n'étant jamais l'élément majeur d'une eau. Il est toujours associé aux bicarbonates, chlorures ou sulfates de calcium ou de sodium (Popoff, 1992; Queneau *et al.*, 2000).

II.1.2 *Orientations du thermalisme*

En France, douze orientations ont été définies par la Sécurité Sociale, pour soulager des troubles aussi variés que l'arthrose ou l'anxiété. La cure thermique est réalisée sur prescription médicale et a une durée de trois semaines. Le traitement thermique a concerné, en 2008, 492 000 personnes (CNETH). Il est à noter que de nombreux établissements thermaux développent aujourd'hui des formats de cures plus courts, ou bien des séjours de remise en forme, qui ne sont pas pris en charge par la Sécurité Sociale. Le Tableau II-1 résume ces orientations et les principales indications revendiquées.

Tableau II-1. Orientations du thermalisme et indications les plus fréquentes (Popoff, 1992; CNETh, 2005).

Orientation	Indications fréquentes
Rhumatologie et traumatismes ostéoarticulaires	Rhumatismes chroniques Arthrose Tendinites Lombalgies Rachis opérés et imparfaitement soulagés Séquelles de traumatismes ostéo-articulaires
Voies respiratoires et affections ORL (<i>enfants dès 3 ans</i>)	Rhinites Otites séreuses Sinusites Pharyngites Asthme Bronchites chroniques Dilatation des bronches
Gynécologie	Algies pelviennes
Phlébologie	Insuffisance veineuse Séquelles de phlébites Cicatrisation des ulcères veineux Diminution des lymphœdèmes
Maladies cardio-artérielles	Artérite des membres inférieurs Hypertension artérielle Angor chronique Syndrome de Raynaud

Maladies de l'appareil digestif et métabolique	<p>Colopathies fonctionnelles</p> <p>Troubles fonctionnels de la digestion</p> <p>Pathologies organiques (colites inflammatoires, maladie de Crohn, recto-colite hémorragique)</p> <p>Diverticulose intestinale</p> <p>Obésité</p> <p>Surcharge pondérale</p> <p>Hyperlipidémies</p> <p>Diabète</p> <p>Goutte</p>
Maladies de l'appareil urinaire	<p>Prévention des récurrences de lithiase urinaire</p> <p>Infections urinaires récurrentes</p> <p>Prostatite récurrente</p>
Neurologie	<p>Névrites</p> <p>Polynévrites</p> <p>Séquelles de zona</p> <p>Hémiplégie</p> <p>Maladie de Parkinson</p>
Affections psychosomatiques	<p>Anxiété</p> <p>Somatisation</p> <p>Asthénie</p> <p>Troubles du sommeil</p> <p>Dépression chronique</p>
Trouble du développement de l'enfant	<p>Eunurésie</p>
Dermatologie (enfants dès 6 mois)	<p>Eczéma de l'adulte et de l'enfant</p> <p>Psoriasis</p> <p>Cicatrices hypertrophiques de brûlures</p> <p>Prurit</p> <p>Urticaire rebelle</p>

Affection de la muqueuse bucco-linguale	Parodontopathies
	Mycoses buccales
	Lichen plan
	Glossites
	Glossodynies

Le nombre d'études pertinentes concernant l'efficacité des pratiques thermales est en augmentation constante, du fait de la demande de démonstration du Service Médical Rendu dans des pays européens tels que la France ou l'Allemagne, où les Assurances Maladies prennent en partie en charge les coûts liés aux cures thermales. Dans ces pays, de nouvelles structures promeuvent la réalisation d'essais *in vitro* ou cliniques, mais aussi d'études socio-économiques dans le but de montrer les bénéfices des traitements thermaux : l'Association Française pour la Recherche Thermale (AFrETH), la Société Française d'Hydrologie et de Climatologie Médicales, l'European Scientific Committee on Thermalism (ESCOT), l'International Society of Medical Hydrology and Climatology (ISMH)...

Le principe thérapeutique d'une EMN n'est pas toujours bien identifié et les auteurs s'accordent en général à penser que plusieurs facteurs entrent en jeu dans le traitement par cure thermale dont la chimie de l'eau, sa température, les effets mécaniques (pression de l'eau durant l'immersion, douches à jets haute pression). Étant donné que la cure représente une période de repos pendant laquelle le patient rompt avec ses activités quotidiennes, un fort effet placebo entre aussi en jeu dans l'efficacité des traitements thermaux (Bender *et al.*, 2005). La reprise d'une activité physique lors de la cure est également considérée comme bénéfique dans le traitement du patient : dans une revue concernant la spondylarthrite ankylosante, van Tubergen *et al.* (2002) indiquent que la pratique sportive améliore significativement l'état du patient. Toutefois, la combinaison d'une activité sportive et d'une cure thermale semble avoir un meilleur effet.

Il est aussi suggéré que l'absorption d'éléments traces à travers la peau a un effet immunomodulateur. Dans une revue concernant les effets de la balnéothérapie en dermatologie, Matz *et al.* (2003) indiquent que les traitements par des eaux sulfurées ont de très bons scores d'efficacité sur des affections impliquant le système immunitaire, comme le psoriasis ou la

dermatite atopique.

Les propriétés microbiologiques d'une EMN ou des boues thermales (produits résultant d'un contact plus ou moins prolongé d'une EMN avec des matériaux minéraux ou organiques) peuvent également être bénéfiques pour la santé. Récemment, Ma'or & Henis (2006) ont montré que la flore endogène d'une boue issue de la Mer Morte pouvait inhiber le développement de pathogènes potentiels tels que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans*. Dans certains cas, la minéralisation d'une EMN permet une activité antimicrobienne vis-à-vis de certains pathogènes. Par exemple, chez les patients atteints de dermatites atopiques, les phases aiguës sont des périodes favorables à une colonisation anormale par *S. aureus*. Inoue *et al.* (1999) ont pu montrer, grâce à des analyses *in vitro*, que l'eau de la source de Kusatsu (Japon), contenant des ions iode et manganèse en milieu acide, avait des propriétés anti-staphylocoques. Cette étude montre parallèlement que des bains réguliers dans la source chaude de Kusatsu permettent de réduire les complications liées à la dermatite atopique.

De manière générale, même si la communauté scientifique ne s'accorde pas toujours sur les causes des bénéfices des EMN, l'impact socio-économique favorable des cures thermales est souvent reconnu : un traitement thermal permet de diminuer les prescriptions de médicaments de manière durable et ainsi de réduire les coûts liés à la santé du patient (van Tubergen *et al.*, 2002).

Le thermalisme est une médecine ancestrale qui se définit par le traitement de certaines affections par des eaux profondes de natures physico-chimiques et microbiologiques particulières. Cette médecine, utilisée aux quatre coins du globe, possède de nombreuses indications et concerne un large éventail de patients de tous âges. En France, par exemple, 500 000 personnes en moyenne sont traitées chaque année par le thermalisme médical. Ce chiffre ne prend pas en compte les séjours courts effectués sans prescription. Si la démonstration du Service Médical Rendu fait actuellement en partie défaut, la recherche thermique est soutenue par diverses associations et de nombreuses études sont publiées chaque année sur les bienfaits des eaux minérales naturelles.

À la frontière entre un établissement de santé et un établissement recevant du public, un établissement thermal se doit de maîtriser les risques liés à l'utilisation d'EMN. En France, l'activité thermique est très surveillée et fait l'objet de nombreuses préconisations visant à la maîtrise de ces risques, décrits dans le chapitre suivant.

II.2 Dangers microbiologiques liés à l'usage de l'eau minérale naturelle

Le patient en traitement thermal peut être exposé à différents dangers dans l'établissement. Un tableau synthétique (Tableau II-2), réalisé par le CNETH, regroupe l'ensemble de ces risques.

Tableau II-2. Exposition aux dangers d'un patient en cure thermale (CNETH, 2008).

Catégorie de dangers	Dangers
Microbiologique	Bactéries, parasites, champignons, virus
Physico-chimique	Hydrocarbures, métaux lourds, résidus de nettoyage, de désinfection, dégradation des matériaux, fluides caloporteurs, gaz
Physique	Particules solides, allergies cutanées aux boues
Radioactivité	Radon

Parmi ces dangers, le plus difficile à maîtriser est le danger microbiologique puisqu'il est lié au traitement thermal et à l'utilisation de l'EMN à proprement parler. L'EMN peut, en effet, être un vecteur de contamination important.

Par ailleurs, compte tenu de la diversité des pathologies pouvant être traitées par le thermalisme, l'état de santé des patients est variable, même si un examen médical permet de vérifier qu'un patient ne présente pas de contre-indications (insuffisance cardiaque, affection de longue durée, immunodépression...). L'âge moyen des patients traités peut être élevé ou bas, en fonction des indications de l'établissement : des sujets âgés fréquentent en majorité les établissements spécialisés en rhumatologie, tandis que des enfants à partir de 6 mois sont admis dans des établissements à orientation dermatologique par exemple. Il existe donc des risques de contaminations importants chez ces patients, dont le système immunitaire peut être affaibli ou immature. D'autre part, les patients en cure peuvent aussi présenter des terrains favorables aux contaminations du fait de la pathologie qu'ils viennent traiter (asthme, sinusites...). L'objet de ce chapitre est donc de comprendre quels risques de contamination microbiologique, liés à l'utilisation de l'EMN, sont encourus par les patients lors d'une cure thermale.

II.2.1 *Exposition et voies de contamination*

Différentes voies de contamination existent : dans la majorité des traitements, la peau ou les muqueuses sont en contact direct avec l'EMN ou les boues thermales, mais des micro-organismes en suspension dans l'air peuvent aussi contaminer les patients par voie aérienne. L'ingestion représente un autre mode de contamination. Enfin, des contaminations interhumaines, par contact direct avec le personnel de l'établissement thermal (massages) ou entre les curistes, peuvent également intervenir et valident l'intérêt du questionnaire initial préalablement à la cure thermale (absence ou signalement de certaines pathologies infectieuses chroniques, comme des onychomycoses par exemple).

Pour limiter les risques de contamination, des recommandations d'entretien des postes de soins (ou points d'usages) ont été éditées à destination des établissements thermaux. Ces recommandations générales visent notamment à éviter des stagnations trop importantes d'EMN, qui favoriseraient le développement microbien, ou indiquent la nature et la fréquence des entretiens pour éviter les contaminations entre curistes. Par exemple, des systèmes de vidange (robinets de purges) doivent être mis en place pour éviter la stagnation de l'eau et il est recommandé d'éliminer le premier jet d'eau avant utilisation. Le poste de soin doit être déconnecté des réseaux d'eau neuve et d'eau usée, pour éviter tout risque de rétro-contamination. L'EMN ne peut pas être recyclée (sauf au niveau des piscines où un traitement est autorisé) et le nombre de postes de soins dans l'établissement doit également correspondre à la fréquentation maximale de curistes. Enfin, les postes doivent être entretenus de manière adaptée (pompeaux de douches nettoyés et désinfectés en fin de journée par exemple).

En France, la réglementation du 19 juin 2000, relative à la gestion du risque microbien dans les établissements thermaux, décrit 3 types de soins, correspondant à 3 types de points d'usage en fonction du degré de contact de l'EMN avec le patient, détaillés ci-dessous (Tableau II-3). Chaque catégorie de soins fait ainsi l'objet d'une surveillance et d'un entretien particuliers.

Tableau II-3. Catégories de soins en établissement thermal et caractéristiques (Abenhaim, 2000).

Catégorie de soins	Caractéristique
1	EMN en contact direct avec muqueuses respiratoires ou susceptibles de provoquer un contact avec les muqueuses oculaires et respiratoires
2	EMN en contact avec les autres muqueuses internes et ingestion d'EMN
3	Soins externes individuels ou collectifs

II.2.1.1 Soins de catégorie 1

Les points d'usage de catégorie 1, dont voici quelques exemples, sont représentés par les soins où l'EMN est en contact avec les muqueuses respiratoires ou susceptibles d'entrer en contact avec les muqueuses oculaires et respiratoires. Ils représentent la catégorie de soins présentant le plus fort risque de contamination via l'EMN, notamment par des pathogènes tels que *L. pneumophila*, et font donc l'objet d'une surveillance accrue. Les analyses microbiologiques de l'eau (recherche et dénombrement de la flore revivifiable à 37 et à 22 °C dans 1 mL, des coliformes dans 250 mL, des entérocoques intestinaux dans 250 mL, des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices dans 100 mL, de *P. aeruginosa* dans 250 mL et de *L. pneumophila* dans 1 L d'EMN) sont réalisées une fois par mois et sont éventuellement portées à une fois par trimestre si aucune contamination n'est constatée pendant un an (Abenhaim, 2000).

II.2.1.1.1 Étuves

Les étuves sont utilisées dans diverses indications comme l'insuffisance veineuse, la rhumatologie ou les soins ORL. Les étuves collectives (vaporarium, émanatorium) sont des salles où l'eau thermale est vaporisée à une température pouvant varier entre 37 et 40 °C. Le but est l'inhalation d'eau thermale sous forme de gouttelettes aérosols (inférieures à 5 µm) capables d'atteindre les voies respiratoires basses afin de traiter des pathologies telles que l'asthme (Salami *et al.*, 2008). D'autres types d'étuves sont utilisés pour une application locale de l'EMN sur une partie du corps (articulations) pour un effet anti-inflammatoire ou antalgique.

L'inhalation d'aérosols étant importante dans ce type de traitements, des précautions doivent être prises pour limiter la transmission de certains pathogènes (*L. pneumophila*). Ainsi, la contamination par le biais de nébulisateurs ou d'humidificateurs a déjà été décrite (Woo *et al.*, 1992). Des précautions particulières doivent être prises pour limiter ces risques, comme le nettoyage quotidien des installations par de l'eau non contaminée et éviter les stagnations d'eau.

II.2.1.1.2 Soins ORL

Les techniques de soins ORL ont pour but de mettre en contact l'EMN avec les muqueuses des voies aériennes supérieures ou inférieures. Les techniques d'inhalation sont très souvent employées (aérosols soniques, humage), ainsi que les soins permettant le lavage de la sphère ORL (bain nasal, irrigations nasales, pulvérisations locales (Syndicat national des médecins des stations thermales, 2004)).

Des accessoires comme des masques d'inhalation, des pistolets de pulvérisation de l'EMN ou des canules peuvent être utilisés. Ici, le risque de contamination inter-curistes doit être évité, c'est pourquoi le matériel à usage unique est privilégié. Dans le cas de matériel réutilisable, les accessoires sont individuels et doivent être nettoyés et désinfectés après usage par l'établissement ou par le curiste (selon un protocole fourni par l'établissement).

II.2.1.2 Soins de catégorie 2

Sont regroupés dans cette catégorie les soins où l'eau est en contact avec les autres muqueuses que celles respiratoires ou oculaires. Il s'agit par exemple des buvettes équipant les établissements thermaux, l'eau de boisson étant préconisée dans certaines cures thermales (maladie de l'appareil urinaire, de l'appareil digestif...) en complément des soins classiques. Le risque de contamination par l'eau étant important dans ce type de soins, la fréquence des analyses microbiologiques (voir II.2.1.1) est mensuelle (flore totale, indicateurs de contamination fécale et *P. aeruginosa*), excepté l'analyse de *L. pneumophila* qui est trimestrielle. La fréquence peut être portée à une par trimestre si aucune contamination n'est constatée pendant 1 an (Abenhaim, 2000).

Au niveau des buvettes, les règles d'hygiène basiques doivent être respectées afin d'éviter les

contamination inter-curistes : interdiction de boire directement au robinet, utilisation de gobelets à usage unique ou gobelets personnels nettoyés, entretien fréquent des becs de buvette. Un écoulement permanent est aussi recommandé pour éviter toute stagnation d'eau.

Certaines cures thermales impliquent des irrigations ou des pulvérisations locales (irrigations vaginales, intestinales, douches gingivales...) qui entrent également dans la catégorie 2 de soins (Syndicat national des médecins des stations thermales, 2004). Comme pour les soins ORL, des accessoires individuels peuvent être utilisés et doivent être à usage unique ou faire l'objet d'une procédure de nettoyage et de désinfection particulière.

II.2.1.3 Soins de catégorie 3

On trouve, dans cette catégorie, tous les soins externes individuels (bains, douches) ou collectifs, comme les couloirs de marche ou les piscines. La fréquence des analyses microbiologiques de cette catégorie de soins est la même que pour la catégorie 2 (Abenhaim, 2000).

II.2.1.3.1 Douches

Différents types de douches sont utilisés pour les soins thermaux. Les douches filiformes (utilisées en dermatologie), les douches pénétrantes (ou modelage sous affusion d'eau thermale) ou encore les douches à jet sont alimentées en EMN et nécessitent un entretien spécifique (voir Figure II-2).



Figure II-2. Exemples de douches utilisant de l'EMN : douche filiforme, douche pénétrante (ou modelage affusion), douche au jet.

Le démontage, le nettoyage et la désinfection réguliers des pommeaux de douches sont

préconisés pour éviter les dépôts de tartre ou oxydes de fer par exemple (dans les établissements alimentés en EMN fortement minéralisée).

II.2.1.3.2 Baignoires

Une grande variété de baignoires peuvent être utilisées pour les bains thermaux : aérobain, hydrobain (douche à pression, en immersion), bain carbogazeux...

Ces baignoires sont souvent équipées d'hydrojets et de buses qui doivent être démontables et nettoyés et désinfectés après usage, afin de limiter les contaminations entre patients. Comme pour les autres dispositifs, il est conseillé de limiter les stagnations d'eau dans les circuits et d'entretenir régulièrement les dispositifs d'arrivée et d'évacuation de l'eau. Pour réduire le risque de contamination par *Legionella*, la hauteur des jets d'eau dans la baignoire doit être adaptée pour éviter la production d'aérosols.

II.2.1.3.3 Piscines

Sous le terme de "piscines thermales" sont regroupés les bains collectifs, les bassins de mobilisation et les couloirs de marche (Figure II-3). Du fait d'un usage collectif, ce sont les seuls équipements où l'EMN peut recevoir un traitement désinfectant afin de limiter la prolifération microbienne.



Figure II-3. Couloir de marche.

Les recommandations de traitement sont proches de celles des piscines de loisirs : désinfection de l'eau par des produits autorisés et adaptés aux caractéristiques physico-chimiques de l'EMN (désinfection par le chlore ou par le brome essentiellement). L'EMN doit être fréquemment renouvelée, de manière adaptée à la fréquentation. Les piscines doivent être équipées de pédiluves et de douches sanitaires (alimentées en eau du réseau d'adduction).

II.2.1.4 Conclusion

Suite à la mise en place de la réglementation du 19 juin 2000, la Direction Générale de la Santé (DGS, 2005) a émis un rapport d'enquête nationale visant à évaluer la qualité microbiologique des EMN dans les établissements thermaux français au cours de l'année 2001. Pour réaliser cette enquête, une base de données nationale a été réalisée, regroupant les résultats des analyses des EMN effectuées par les DDASS. Cette base de données a permis de calculer les taux de conformité des établissements. Les paramètres microbiologiques testés étaient la détection de bactéries anaérobies sporulées sulfato-réductrices (dans 100 mL d'EMN), d'entérocoques (dans 250 mL d'EMN), de coliformes (dans 250 mL d'EMN) dont *E. coli* (dans 250 mL d'EMN), de *P. aeruginosa* (dans 250 mL d'EMN) et de *Legionella spp.* dont *L. pneumophila* (dans 1 litre d'EMN).

Les résultats de cette enquête font apparaître que la majorité des établissements thermaux maîtrise globalement la contamination par des micro-organismes témoins de contamination fécale dans les EMN, puisque 80 à 90 % des établissements étaient conformes (nombre d'établissements dont 100 % des analyses sont conformes / nombre total d'établissements). En revanche, 1/3 des établissements présente au cours de l'année au moins une contamination par *L. pneumophila* et 2/3 des établissements une contamination par *P. aeruginosa* (Tableau II-4).

Tableau II-4. Taux de conformité des établissements thermaux français pour les paramètres microbiologiques de l'EMN, sur l'année 2001 (DGS, 2005).

Paramètre testé	Nombre d'établissements conformes	Nombre total d'établissements	Taux d'établissements conformes (%)
Bactéries anaérobies sporulées sulfato-réductrices	105	118	89
Entérocoques	97	119	82
Coliformes	96	118	81
<i>E. coli</i>	88	119	74
<i>P. aeruginosa</i>	39	118	33
<i>Legionella spp.</i>	63	105	60
<i>L. pneumophila</i>	71	116	61

Il ressort de cette enquête que *P. aeruginosa* et *L. pneumophila* sont deux bactéries bien présentes au niveau des réseaux d'EMN des établissements thermaux et constituent donc le risque microbiologique principal lié à l'utilisation de l'eau thermale. Compte tenu de la pathogénicité potentielle de ces deux bactéries et des soins dispensés, les risques de contaminations peuvent être élevés. Même si peu de données sont actuellement disponibles sur les cas de légionelloses ou d'infections par *P. aeruginosa* liés à une cure thermale, les résultats de cette enquête montrent que la qualité microbiologique de l'EMN aux différents points d'usages des établissements thermaux doit être constamment surveillée et maîtrisée.

La cure thermale est un traitement qui s'adresse à une grande variété de patients, tant au niveau de l'âge que des pathologies traitées. Au cours de la cure, ces patients sont en contact étroit avec les eaux minérales naturelles. La fragilité de certains curistes impose donc une vigilance particulière quant aux risques de contamination microbiologique liés aux différents types d'utilisation de l'EMN. Ainsi, le rapport du Conseil Supérieur de l'Hygiène Publique de France (CSHPF) émis en mai 1999 a pour objet la description et la gestion de ces risques (CSHPF *et al.*, 1999).

Compte tenu de la diversité des soins dispensés, trois catégories de points d'usage ont été définies par le CSHPF et repris dans la réglementation du 19 juin 2000, en fonction du degré de contact de l'EMN avec le patient. Cette catégorisation permet notamment de mieux maîtriser les risques liés aux deux bactéries les plus souvent isolées dans les réseaux des établissements thermaux : *P. aeruginosa* et *L. pneumophila*. L'objet des deux prochains paragraphes est de faire l'état des connaissances actuelles concernant ces micro-organismes potentiellement pathogènes afin de mieux cerner les risques qu'ils représentent au sein d'un établissement thermal.

II.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

II.2.2.1 **Taxonomie et caractéristiques biologiques**

L'ordre des Pseudomonadales, placé dans la classe des γ -proteobacteria, est constitué de la famille des Pseudomonadaceae et de la famille des Moraxellaceae. Au sein des Pseudomonadaceae, les *Pseudomonas sensu stricto* se divisent en deux grands groupes : le groupe de *P. aeruginosa*, dans lequel on trouve les espèces *P. syringae*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. aeruginosa*, et le groupe de *P. pertucinogena*. Le genre *Pseudomonas*, identifié depuis 1894, a subi de nombreux remaniements avant d'aboutir, à l'heure actuelle, à un groupe de 54 espèces, classées selon leurs critères phénotypiques et génotypiques. Il s'agit de bacilles à Gram négatif, aérobies stricts et mobiles grâce à des flagelles monotriches ou multitranches polaires. Ils sont chimio-organotrophes à métabolisme oxydatif (non fermentant), et croissent facilement sur les milieux de culture usuels à des températures variant entre 4 et 41 °C. Leur taille varie de 0,5 à 1 μm de large et 1 à 4 μm de long. La respiration anaérobie a été décrite (utilisation de nitrates). Certaines espèces produisent un pigment caractéristique, la pyoverdine, de couleur jaune à vert et fluorescent, synthétisée lorsque la bactérie se trouve dans un milieu carencé en fer. Il s'agit en fait d'un sidérophore qui complexe les ions ferriques et facilite leur transport à travers la membrane. Parmi les espèces fluorescentes, on trouve *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* ainsi que des espèces phyto-pathogènes comme *P. syringae* (Terrier *et al.*, 1992).

Parmi le genre *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* est l'espèce la plus connue et la mieux étudiée, grâce notamment au séquençage complet de son génome (souche PAO1) publié en 2000 (Stover *et al.*, 2000). Avec 6,3 millions de paires de bases, il s'agit d'un des plus grands génomes bactériens séquencés. Sa complexité et sa taille sont très vraisemblablement à l'origine de la grande capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* à des environnements très variés : il peut transporter, métaboliser de nombreux substrats organiques, possède de nombreux sidérophores ainsi que des systèmes d'efflux (en particulier de la famille RND, Resistance/Nodulation/Cell Division) et des systèmes de sécrétion. Au cours du temps, *P. aeruginosa* semble avoir acquis des mécanismes lui permettant de résister à de nombreux composés antimicrobiens, comme des porines spécifiques limitant la pénétration de certaines molécules hydrophiles ou des pompes d'efflux (Stover *et al.*, 2000).

II.2.2.2 Réservoirs

P. aeruginosa est une bactérie ubiquiste souvent isolée dans les eaux (douces, polluées ou non, stagnantes, courantes ou eaux de mer) mais également dans les sols, sur des végétaux, des poussières en suspension dans l'air (Terrier *et al.*, 1992). La colonisation d'aliments, plus particulièrement de végétaux crus est fréquente et constitue un des modes de contamination humaine (Oie *et al.*, 2008) au même titre que le contact avec des eaux contaminées. Ses exigences nutritives modestes lui permettent de survivre et de se multiplier dans des milieux très pauvres (Kayser *et al.*, 1975) et également sur des surfaces humides. Il est fréquemment rencontré en milieu hospitalier, dans les éviers, les siphons, les vases, les cantines, sur les objets ou le linge de toilette, ainsi qu'au niveau de solutions antiseptiques.

La colonisation des réseaux d'eau par *P. aeruginosa* est liée à sa capacité à former des biofilms, communautés de micro-organismes fixées à des surfaces. Les biofilms peuvent coloniser des tissus, *in vivo* (poumons de patients atteints de mucoviscidose (Ryder *et al.*, 2007)) ou des surfaces abiotiques, comme les canalisations d'eau (Trautmann *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* est d'ailleurs un micro-organisme modèle pour les études sur biofilms (O'Toole *et al.*, 1998; Knezevic *et al.*, 2008; Parsek *et al.*, 2008). Ainsi, cette bactérie est fréquemment isolée de biofilms aquatiques (Moritz *et al.*; Trautmann *et al.*, 2005) et les avantages qu'elle tire de ce mode de prolifération seront détaillés dans le paragraphe II.2.2.5.1.

II.2.2.3 Risque infectieux et pouvoir pathogène

La liste des infections liées à *P. aeruginosa* est longue et non-exhaustive. Les infections sont d'abord locales avant de se généraliser si aucun traitement n'est appliqué ou si le traitement est inefficace. *P. aeruginosa*, en tant que pathogène opportuniste, colonise puis infecte préférentiellement les sujets immunodéprimés ou affaiblis comme les grands brûlés, les cancéreux, patients en unités de soins intensifs, transplantés, dialysés ou sujets atteints de mucoviscidose, ce qui explique notamment sa prévalence en milieu hospitalier et la réglementation actuelle (absence dans 100 mL d'eau pour un réseau hospitalier, absence dans 250 mL d'eau en réseau d'EMN). *P. aeruginosa* est en effet responsable d'environ 10 % des infections nosocomiales en France en 2006, ce qui en fait la 3^{ème} bactérie la plus souvent responsable d'infections nosocomiales (Tableau II-5), selon l'Institut Veille Sanitaire (InVS). La virulence des souches entre aussi en ligne de compte dans le déclenchement d'une infection.

Tableau II-5. Prévalence des micro-organismes associés à des infections nosocomiales en France en 2006 (InVS).

Micro-organisme	N	Part relative (%)
<i>Escherichia coli</i>	3896	24,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	2980	18,9
<i>P. aeruginosa</i>	1583	10,0
Staphylocoques à coagulase négative	1029	6,5
Enterocoques	1010	6,4
<i>Proteus mirabilis</i>	624	3,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	546	3,5
Streptocoques non <i>pneumoniae</i> ou <i>pyogenes</i>	551	3,2
<i>Enterobacter cloacae</i>	480	3,0
<i>Candida albicans</i>	433	3,7
<i>Enterobacter aerogenes</i>	208	1,3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	188	1,2
<i>Candida non albicans</i>	182	1,2
<i>Clostridium difficile</i>	176	1,1
<i>Moraxella</i> spp.	171	1,1
Autres	1783	11,3
Total	15800	100,0

On peut lister trois modes de contamination principaux qui permettent de mieux comprendre l'origine des risques en établissement thermal.

- Voie cutanéomuqueuse

La pénétration se produit ici par contact direct d'un individu avec une source de contamination. La bactérie cause alors préférentiellement l'infection de zones cutanées humides (aine, aisselle), de plaies ou de brûlures. Les sources de contamination sont multiples (éponges, linges, eaux). En secteur hospitalier, il est généralement admis que la transmission se produit par manuportage de la bactérie par le personnel, cependant l'eau est le plus souvent incriminée (Trautmann *et al.*, 2005). La transmission se produit lors des toilettes ou par du

matériel médical plus ou moins invasif et rincé par de l'eau contaminée (endoscopes, bronchoscopes, bassins) (Muscarella, 2004).

En établissement thermal, toutes les catégories de soins peuvent être à l'origine de ce mode de contamination, l'exposition à des sources d'eaux contaminées pouvant provoquer des folliculites, un syndrome des « ongles verts » ou de « pied chaud ». La sphère ORL peut également être affectée (otite externe) (Kerr *et al.*, 2009).

- Voie respiratoire

L'inhalation d'aérosols contaminés constitue une voie de pénétration chez certains individus, notamment des patients atteints de mucoviscidose. Les humidificateurs, les systèmes de climatisation, les nébulisateurs ou les respirateurs artificiels sont de possibles vecteurs de la bactérie. Les soins de catégorie 1 (inhalateurs, étuves...) peuvent donc être à l'origine de contaminations des voies respiratoires en milieu thermal, causant ainsi des pneumonies ou des bactériémies (Kerr *et al.*, 2009).

- Voie oro-digestive

La pénétration du bacille pyocyanique dans l'organisme humain par le biais de l'alimentation est fréquente et peut être à l'origine d'infections digestives, en liaison avec la charge bactérienne et l'état de l'hôte. L'absorption liée à la consommation de légumes a ainsi été décrite (Oie *et al.*, 2008). Même si les EMN contiennent une microflore autochtone essentiellement constituée de bactéries du genre *Pseudomonas* (*P. veronii*, *P. rhodesiae*, *P. jensenii*, *P. mandelii*, *P. gessardii*...), *P. aeruginosa* n'est normalement pas présente au niveau des émergences (Leclerc *et al.*, 2002). Des études montrent cependant que la bactérie peut se maintenir pendant 5 ans dans des EMN embouteillées, en cas de contamination accidentelle (Legnani *et al.*, 1999). Au niveau des établissements thermaux, prévenir la contamination des points d'usage de catégorie 2 (buvettes notamment) est donc essentiel afin d'éviter les contaminations par voie digestive.

II.2.2.4 Facteurs de virulence

Si *P. aeruginosa* est à l'origine de nombreuses pathologies, les facteurs de virulence de cette bactérie sont surtout décrits dans le cadre de modèles murins d'infections pulmonaires représentatives de celles observées chez les patients atteints de mucoviscidose (van

Heeckeren *et al.*, 2002). Cependant, d'autres modèles sont utilisés pour déterminer les facteurs de virulence de cette bactérie, comme des modèles murins d'infection de brûlures, l'infiltration de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* ou la colonisation de *Caenorhabditis elengans*. De nombreux facteurs de virulence identifiés sont redondants (Hendrickson *et al.*, 2001), d'où l'on déduit que les facteurs impliqués dans les pathologies pulmonaires le sont aussi dans d'autres types de pathologies. Ces facteurs peuvent être situés à la surface cellulaire, sécrétés ou directement injectés aux cellules de l'hôte via un système de sécrétion de type 3. Ils sont énumérés dans le Tableau II-6.

Tableau II-6. Facteurs de virulence de *P. aeruginosa* et rôles.

Adapté de Kipnis *et al.* (2006).

Type	Facteur de virulence	Rôle
Facteurs de virulence de la surface bactérienne	Flagelle	Mobilité (« nage ») Adhésion aux cellules épithéliales Inhibition de la réponse inflammatoire médiée par NFκB
	Pili	Motilité Adhésion aux cellules épithéliales
	LPS	Liaison asialoGM1, CFTR Reconnaissance de TLR4/CD12 et TLR4/MD2
	Alginate	Protection contre la phagocytose, les antibiotiques ou atténuation de la réponse de l'hôte Architecture du biofilm
Facteurs de virulence sécrétés	Pyocyanine	Augmentation de l'IL8 Atténuation de la réponse de l'hôte Apoptose des neutrophiles Augmentation du stress oxydatif lié à l'inflammation Possible détérioration des canaux chlorure CFTR

Type	Facteur de virulence	Rôle
	Pyoverdine	Sidérophore Régulation de la sécrétion de ExoA
	Protéase alcaline	Lyse de la fibrine
	Protéase IV	Lyse des protéines A, D et B (surfactants pulmonaires)
	Élastase	Destruction de l'épithélium respiratoire (destruction des jonctions serrées)
	Phospholipase C	Hémolytique Destruction des phospholipides membranaires Inactivation du surfactant
	Exotoxine A	Inhibition du facteur d'élongation 2 menant à l'inhibition de la synthèse protéique et donc à la mort cellulaire
Facteurs de virulence injectés via le SST3	Exotoxine S	ADP-ribosyl transférase (désorganisation du cytosquelette) Protéine activatrice des Rho- GTPase Liaison à TLR2 et TLR4 (modulation des réponses immunitaires et inflammatoires)
	Exotoxine T	ADP-ribosyl transférase (désorganisation du cytosquelette) Protéine activatrice des Rho- GTPase
	Exotoxine Y	Augmentation du AMPc cytosolique conduisant à l'augmentation de la perméabilité pulmonaire

Type	Facteur de virulence	Rôle
	Exotoxine U	Activité phospholipase/lysophospholipase menant à la désorganisation des membranes cellulaires eucaryotes

Le flagelle et les pili sont considérés comme des facteurs de virulence importants. Ils sont impliqués, d'une part, dans le mouvement bactérien et, d'autre part, dans l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales de l'hôte. Parmi les facteurs surfaciques, le lipopolysaccharide (LPS), situé sur la face externe de la membrane externe, joue aussi un rôle dans l'adhésion ainsi qu'en tant qu'activateur de la réponse inflammatoire. Les souches de *P. aeruginosa* isolées chez des patients atteints de mucoviscidose sont généralement productrices d'exopolysaccharides mucoïdes, principalement des alginates. Ces molécules participent notamment à la résistance de la bactérie par diminution de la diffusion des antibiotiques. Les alginates, comme le mucus pulmonaire particulièrement épais des patients atteints de mucoviscidose, participent à la fixation des bactéries sous forme de biofilm, étape importante de la colonisation bactérienne (voir paragraphe II.2.4.3.2.1).

Parmi les facteurs de virulence bactériens sécrétés, on retrouve les pigments diffusibles comme la pyocyanine (bleu) et la pyoverdine (vert jaune), agents chélateurs du fer. Ils jouent un rôle dans la persistance et la croissance de la bactérie grâce à leur capacité de déplacement du fer lié *in vivo* à la lactoferrine ou à la transferrine. D'autres enzymes sécrétées participent à la lyse du surfactant pulmonaire ou à la destruction de l'épithélium respiratoire. La phospholipase C a la capacité de libérer les phosphorylcholines de la sphingomyéline et de la phosphatidylcholine, composants majeurs du surfactant pulmonaire.

Les toxines sécrétées par le biais de systèmes de sécrétion sont particulièrement bien représentées chez *P. aeruginosa* : 5 systèmes de sécrétion ont été décrits, des types I, II, III, V et VI (Engel *et al.*, 2009). Plus particulièrement, le système de sécrétion de type III permet l'injection directe de toxines dans la cellule de l'hôte.

II.2.2.5 Sensibilité aux molécules antimicrobiennes

II.2.2.5.1 Antibiotiques

En tant que bactérie ubiquiste, *P. aeruginosa* est une bactérie capable de s'adapter à différents environnements et est naturellement résistante à de nombreuses molécules normalement toxiques pour la croissance bactérienne. Sa résistance naturelle ou acquise aux antibiotiques est une bonne illustration de cette propriété. Quatre familles d'antibiotiques peuvent être utilisées pour lutter contre une infection à *P. aeruginosa* (Tableau II-7). Or, pour chacune de ces familles, au moins un mécanisme de résistance a été décrit, comme le montre la revue de Hancock & Speert (2000), Tableau II-7.

Tableau II-7. Principaux mécanismes de résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques (Hancock *et al.*, 2000).

Famille d'antibiotiques	Antibiotiques	Mécanismes de résistance
Pénicillines (β -lactamines)	Ticarcilline	Dérépression d'une β -lactamase
	Carbénicilline	chromosomique
	Pipéracilline	Surexpression de la pompe d'efflux MexAB-OprM Expression de β -lactamases plasmidiques
Céphalosporines (β -lactamines)	Ceftazidime	Dérépression d'une β -lactamase
	Céfopérazone	chromosomique
	Céfépime	Surexpression de la pompe d'efflux MexAB-OprM
	Cefpirome	Surexpression de la pompe d'efflux MexCD-OprJ (céphalosporines de 4 ^{ème} génération)
Carbapénèmes (β -lactamines)	Imipénème	Perte de la porine OprD
	Méropénème	Surexpression des pompe d'efflux MexEF-OprF et MexAB-OprM (Méropénème)
Aminoglycosides	Gentamicine	Surexpression de la pompe d'efflux MexXY
	Tobramycine	Production d'enzymes plasmidiques modifiant
	Amikacine	l'antibiotique

Famille d'antibiotiques	Antibiotiques	Mécanismes de résistance
Quinolones	Ciprofloxacine	Mutation du gène codant pour la sous-unité topoisomérase de GyrA (parfois GyrB) Surexpression des pompes d'efflux
Polymyxines	Colistine	Modification du LPS (<i>in vitro</i> seulement)

La résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* s'explique par la combinaison de deux phénomènes : d'une part la faible perméabilité de la membrane externe aux molécules hydrophiles (10 à 100 fois moins perméable que d'autres bactéries à Gram négatif) et d'autre part la présence de nombreux systèmes d'efflux ou d'enzymes de dégradation des antibiotiques. L'importance de la perméabilité membranaire dans la résistance aux antibiotiques a été démontrée par l'ajout de peptides cationiques modifiant les propriétés membranaires et qui permettent d'augmenter la sensibilité de la bactérie (Hancock *et al.*, 2000).

La présence de très nombreux systèmes d'efflux chez *P. aeruginosa* a notamment été révélée par le séquençage complet du génome de la souche PAO1 (Stover *et al.*, 2000). Les cinq familles de système d'efflux sont représentées : MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance family) qui exportent certains désinfectants comme les ammonium quaternaires (Cattoir, 2004), MATE (Multirug And Toxic compound Extrusion family), transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette family) et RND (Resistance/Nodulation/Cell Division) (Tableau II-7). La famille des RND est particulièrement importante, avec 10 gènes putatifs identifiés, contre 4 seulement chez *E. coli*.

II.2.2.5.1 Désinfectants

Les bactéries à Gram négatif sont, de manière générale, moins sensibles aux antiseptiques et désinfectants que les bactéries à Gram positif, non-sporulées. Parmi les bactéries à Gram négatif, *P. aeruginosa* apparaît généralement comme le plus résistant. Ce phénomène est illustré par les différentes valeurs de CMI de 10 antiseptiques ou désinfectants vis-à-vis de *E. coli* et *P. aeruginosa* (Tableau II-8 (McDonnell *et al.*, 1999)).

Tableau II-8. CMI de 10 antiseptiques et désinfectants vis-à-vis de *E. coli* et *P. aeruginosa* (McDonnell *et al.*, 1999).

Agent biocide	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Chlorure de benzalkonium	50	250
Chlorure de benzethonium	32	250
Cétrimide	16	64-128
Chlorhexidine	1	5-60
Hexachlorophène	12,5	250
Phénol	2000	2000
o-phénylphénol	500	1000
Iséthionate de propamine	64	256
Iséthionate de dibromopropamine	4	32
Triclosan	5	>300

Les CMB obtenues vis-à-vis de l'hypochlorite de sodium pour *P. aeruginosa* sont également deux fois supérieures à celles nécessaires vis-à-vis d'*E. coli* (Samrakandi, 1996).

La membrane externe des bactéries à Gram négatif joue le rôle d'une barrière qui inhibe l'entrée des molécules hydrophobes. Ce phénomène a été démontré par l'étude de souches de *E. coli*, *S. typhimurium*, et *P. aeruginosa*, mutées au niveau d'un facteur surfacique. Les résultats observés montrent que les bactéries mutées sont plus sensibles aux antibiotiques et désinfectants hydrophobes. La membrane externe des bactéries à Gram négatif joue donc un rôle dans la sensibilité de la bactérie aux antimicrobiens, très vraisemblablement par le biais du LPS (McDonnell *et al.*, 1999). Parallèlement, *P. aeruginosa* possède des porines spécifiques limitant l'entrée des molécules hydrophiles.

Un des mécanismes importants de résistance aux traitements pour la bactérie *P. aeruginosa* est sa capacité à former des biofilms. Une fois fixés, les micro-organismes résistent mieux aux traitements antimicrobiens (antibiotiques ou biocides) que leurs équivalents planctoniques (bactéries en suspension dans un liquide) (Mah *et al.*, 2001). Plusieurs mécanismes sont évoqués pour expliquer la résistance des bactéries sous forme de biofilm, notamment la

difficulté de pénétration des agents antimicrobiens, la présence de bactéries à croissance lente, l'activation de la réponse au stress via le facteur σ RpoS (Mah *et al.*, 2001). La limitation d'accessibilité des cellules de *P. aeruginosa* est augmentée par une structuration en biofilm. Ce phénomène a notamment été mis en évidence par Samrankandi *et al.* (1997). Le niveau de production de polysaccharides extracellulaires, influencé par les conditions de croissance du biofilm, est corrélé à une meilleure tolérance à des traitements chlorés. La colonisation d'un réseau par *P. aeruginosa* est donc souvent associée à la présence d'un biofilm qui sert de réservoir à la bactérie (voir chapitre I.2.4) et conduit à une certaine tolérance aux traitements.

***P. aeruginosa* est un bacille à Gram négatif ubiquiste et bien présent dans les milieux humides. Grâce à ses exigences nutritives modestes, il a la capacité de proliférer dans les réseaux d'eau.**

En tant que pathogène opportuniste, il colonise et infecte préférentiellement des organismes affaiblis (immunodéprimés, patients atteints de mucoviscidose...). Les voies d'entrée sont variées : oro-digestive, respiratoire, mais également par contact avec la peau ou les muqueuses lésées. *P. aeruginosa* est à l'origine de pathologies liées à ses nombreux facteurs de virulence. Il est naturellement doté de systèmes de résistance aux antimicrobiens qui en font une bactérie difficile à éradiquer.

L'eau est un vecteur de propagation de la bactérie à ne pas négliger, notamment dans les établissements thermaux. La capacité de *P. aeruginosa* à former des biofilms, propriété importante de cette bactérie, accroît sa résistance vis-à-vis de chocs de désinfection et permet sa persistance dans les réseaux. La présence de cette bactérie dans un réseau doit donc être particulièrement contrôlée, et les moyens de maîtrise adaptés notamment à la limitation de la formation ou l'élimination du biofilm.

II.2.3 *Legionella pneumophila*

La bactérie *L. pneumophila* a été identifiée suite à une épidémie lors du 58^{ème} congrès de la Légion Américaine, à Philadelphie (États-Unis) en 1976. Cent quatre-vingt deux participants ont été touchés par une pneumopathie d'origine inconnue, nommée maladie du Légionnaire, et 32 d'entre eux en sont morts. En 1977, Mac Dade *et al.* (1977), chercheurs au Center for Disease Control, ont isolé la bactérie responsable de l'épidémie à partir de cochons d'Inde. Ce n'est qu'en 1979 que ce micro-organisme a été décrit et nommé *Legionella pneumophila* (Brenner *et al.*, 1979). Plus tard, l'enquête a démontré que le système de climatisation de l'hôtel dans lequel résidaient les patients était à l'origine de l'épidémie.

II.2.3.1 *Taxonomie et caractéristiques biologiques*

La famille des Legionellaceae, appartenant à l'ordre des Legionellales (γ -protéobactéries), comprend un seul genre, *Legionella* (Fields *et al.*, 2002). L'espèce la plus proche d'un point de vue phylogénétique est *Coxiella burnettii*, agent de la fièvre Q, qui appartient également à l'ordre des Legionellales. Ce micro-organisme partage 42 % de gènes communs avec *Legionella* (Chien *et al.*, 2004) et a un mode de répllication intracellulaire similaire.

La souche historiquement isolée sur le site de la première épidémie identifiée de légionellose (Philadelphie, 1976) a été entièrement séquencée en 2004. Cette étude a montré que 60% des gènes de *L. pneumophila* sont des homologues de gènes d'autres bactéries intracellulaires (*Coxiella*, *Salmonella*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Mycobacterium*), bien que ces espèces ne soient pas toujours phylogénétiquement proches. Le genre *Legionella* comporte actuellement 48 espèces et 70 sérogoupes, dont 15 sont associés à l'espèce *L. pneumophila*. Selon Fields *et al.* (2002), 20 espèces ont déjà été associées à une légionellose, même si 90 % des cas décrits sont liés à *L. pneumophila*.

L. pneumophila est un bacille à Gram négatif (prenant faiblement la coloration par le rouge neutre ou la safranine), aérobic strict, catalase positive, non sporulé et non capsulé. Les cellules mesurent 0,3 à 0,9 μm de large sur 2 à 20 μm de long. *L. pneumophila* possède également un à deux flagelles en position polaire ou subpolaire (Ott *et al.*, 1991). Son caractère fortement plésiomorphe serait lié à l'âge des cultures : des cultures jeunes sont

majoritairement formées de coccobacilles de 2 à 6 μm , tandis que des cultures plus âgées présentent des formes filamenteuses de plus de 20 μm de long (Harrison *et al.*, 1988).

Le défaut de coloration par le rouge neutre ou la safranine utilisée pour la coloration de Gram est lié aux caractéristiques de la paroi, riche en acides gras ramifiés. La paroi contient également des ubiquinones dont les chaînes latérales sont constituées de 9 à 14 unités isoprènes qui participent à l'hydrophobicité générale de la cellule. La plupart des espèces produisent des β -lactamases et sont capables d'hydrolyser la gélatine ; les réactions d'oxydase, de réduction des nitrates, et d'uréase sont négatives. Les sucres ne sont ni fermentés ni oxydés et la seule source de carbone provient des acides aminés. Seule *L. pneumophila* a la capacité d'hydrolyser l'hippurate (exception faite des sérogroupes 4 et 15).

Les bactéries du genre *Legionella* sont des micro-organismes fastidieux qui ne poussent que sur un milieu à base d'extrait de levure appelé BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract). Même si, à l'origine, l'isolement de *Legionella* a été réalisé sur milieu Mueller-Hinton supplémenté en hémoglobine et IsoVitalex, les composants essentiels de ce milieu ont été identifiés comme étant le fer (contenu dans l'hémoglobine) et la L-cystéine (contenu dans l'IsoVitalex). Ainsi la composition du milieu a été modifiée pour donner naissance au « F-G agar », milieu supplémenté en L-cystéine et phosphate ferrique. Plus tard, les améliorations de ce milieu ont conduit à la mise au point du milieu BCYE par Feeley *et al.* (1979), milieu à base d'extrait de levure détoxifié par du charbon actif (Charcoal Yeast Extract Agar), dont le pH est de 6,9. L'aspect des colonies est très variable selon les espèces mais aussi selon les sérogroupes : la couleur varie du blanc au gris parfois rosé, avec un centre marqué. Observées à la loupe binoculaire, les colonies présentent un aspect de verre fritté. Il est à noter que le milieu de culture liquide BYE (Buffered Yeast Extract), milieu filtré (membrane de porosité nominale de 0,2 μm), peut aussi être utilisé, sans ajout de charbon.

Les études montrent que la température optimale de développement de la bactérie dans le milieu BCYE est de 37 °C. Konishi *et al.* (2006) ont toutefois montré que certaines souches étaient capables de se multiplier jusqu'à 44 °C, ce qui explique en partie la présence non négligeable de légionelles dans les réseaux d'eau chaude.

II.2.3.2 Réservoirs

L. pneumophila est une bactérie ubiquiste hydrotellurique et est, par conséquent, retrouvée dans de nombreux réservoirs d'eau douce, type lacs et rivières (Fliermans *et al.*, 1981). Elle a parfois été mise en évidence dans des prélèvements d'humus destiné au jardinage, dont la manipulation a entraîné des contaminations (Wallis *et al.*, 2005). L'eau de mer n'est pas *a priori* un réservoir de la bactérie, pourtant l'étude de Heller *et al.* (Heller *et al.*, 1998) montre que *L. pneumophila* est capable de résister à des concentrations en NaCl de 3 %. *L. pneumophila* a, en outre, la capacité de se maintenir jusqu'à 125 jours dans de l'eau du réseau d'adduction publique stérile (Steinert *et al.*, 1997).

Son caractère ubiquitaire lui permet de coloniser de nombreux environnements artificiels, comme les réseaux d'eau chaude sanitaire (Stout *et al.*, 1985) et les équipements qui y sont reliés : robinetterie, douches (Bollin *et al.*, 1985). Les systèmes de climatisation, humidificateurs, fontaines et tours aéroréfrigérantes sont également concernés. Ces appareils ont pour caractéristique la production d'aérosols dont l'inhalation peut aboutir au développement d'une pathologie (Bollin *et al.*, 1985; Jarraud *et al.*, 2002).

Plusieurs facteurs de colonisation des réseaux d'eau ont été identifiés. La température élevée de l'eau (entre 25 et 40 °C) est en général un facteur favorisant fortement la présence de *Legionella*. Des légionelles ont pu être détectées à des températures atteignant 63 °C (Fliermans *et al.*, 1981; Golovlev, 2000; Soderberg *et al.*, 2008). La diminution de la température de l'eau dans des tours aéroréfrigérantes semble par ailleurs un bon moyen de contrôle de la prolifération de ces bactéries (Kusnetsov *et al.*, 1997). Il est à noter que des *Legionellaceae*, dont *L. pneumophila*, ont pu être isolés dans des lacs polaires en Antarctique (Carvalho *et al.*, 2008), ce qui démontre la grande résistance de ces micro-organismes vis-à-vis de conditions extrêmes. La corrosion, le tartre, les dépôts sédimentaires dans les canalisations (Stout *et al.*, 1985) sont autant de facteurs favorisant la colonisation par *L. pneumophila*.

La minéralisation d'une eau joue un rôle important dans le maintien de *L. pneumophila*. Ohno *et al.* (2003) ont pu montrer que la bactérie pouvait maintenir son activité métabolique pendant un mois dans 19 EMN japonaises (non stérilisées), même si la cultivabilité était perdue. Par contre, après 5 jours d'incubation dans une eau distillée, aucune bactérie

métaboliquement active n'est détectée. *L. pneumophila* est souvent détectée dans des eaux minérales naturelles, qu'elles soient embouteillées (Klont *et al.*, 2006) ou utilisées à des fins récréatives (piscines, spas) (Sukthana *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2010). Ainsi, la possibilité de contaminations humaines liées à l'usage d'eaux minérales a déjà été décrite (Leoni *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2006).

La présence de *L. pneumophila* dans une eau est très souvent corrélée à la présence d'amibes (Steinert *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2004; Lasheras *et al.*, 2006), compte tenu de sa capacité à se répliquer à l'intérieur de ces cellules (voir chapitre I.2.3.3.2.). La plupart des auteurs considèrent même que *L. pneumophila* ne peut se multiplier, dans un réseau d'eau, qu'en présence d'amibes (Murga *et al.*, 2001). Plus récemment, des études envisagent le maintien de la bactérie grâce à des interactions commensales avec des espèces bactériennes classiques de la flore classique des réseaux d'eau.

II.2.3.2.1 Interaction avec les amibes et cycle de répllication intracellulaire

La capacité de *L. pneumophila* à se répliquer à l'intérieur des amibes a été observée pour la première fois par Rowbotham (1980). Pour démontrer la pathogénicité de *L. pneumophila* vis-à-vis des amibes (notamment *Acanthamoeba castellanii* et *A. polyphaga*), les protozoaires ont étéensemencés en un point d'une boîte de Petri contenant *Klebsiella pneumoniae* sous forme inactivée, servant de substrat nutritif pour les amibes. La croissance des amibes conduit normalement au recouvrement total de la boîte de Petri après 3 à 5 jours d'incubation. En ensemencant une ligne de *L. pneumophila* à travers la boîte de Petri, Rowbotham a observé l'arrêt de la croissance amibienne. Des observations microscopiques ont en outre mis en évidence la lyse des amibes par *L. pneumophila*.

Dans l'environnement, *L. pneumophila* cohabite avec de nombreuses espèces de microorganismes procaryotes ou eucaryotes, dont des protozoaires. En temps normal, ces protozoaires se nourrissent de bactéries sous forme de biofilms, qu'elles « broutent ». Toutefois les légionelles ont la capacité d'échapper à la digestion des protozoaires et de les utiliser pour se multiplier de manière intracellulaire, selon le cycle décrit dans la Figure II-4.

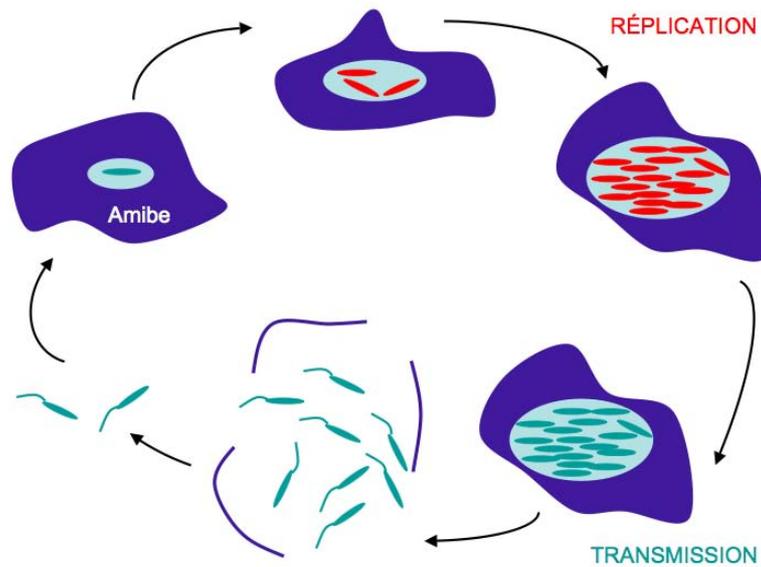


Figure II-4. Cycle de réplication de *L. pneumophila* à l'intérieur de protozoaires (Molofsky *et al.*, 2004).

Dans un premier temps, la bactérie adhère à la surface de l'amibe par un mécanisme qui n'est pas complètement élucidé. On sait toutefois que le pilus de type IV situé à la surface bactérienne se lie à une lectine de *Hartmannella vermiformis* (Harb *et al.*, 2000). La bactérie est alors phagocytée et se retrouve alors dans une vacuole censée fusionner avec le lysosome afin d'être digérée. Or, comme d'autres micro-organismes à développement intracellulaire, *L. pneumophila* a la capacité d'échapper à la digestion endosomale de l'hôte (Gruenberg *et al.*, 2006) grâce, notamment, au système Dot/Icm, système de sécrétion de type IVB. Par ce biais, la bactérie injecte dans la cellule hôte des facteurs perturbant le trafic vésiculaire et empêchant la fusion du phagosome avec le lysosome (Coers *et al.*, 1999; Shohdy *et al.*, 2005). La vacuole dans laquelle se trouvent les légionelles devient alors un compartiment de réplication.

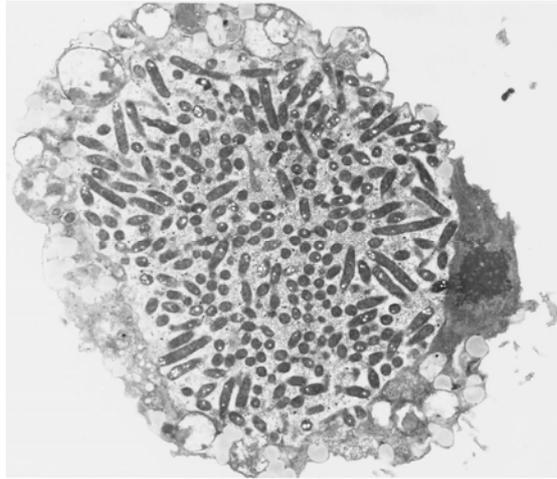


Figure II-5. Cellule de *Hartmanella vermiformis* infectée par *L. pneumophila*, 12 h après infection (grossissement $\times 3400$). (Abu Kwaik *et al.*, 1998)

De nombreuses mitochondries et vésicules, ainsi que le réticulum endoplasmique granuleux sont recrutés à proximité de la vacuole de répliation. La bactérie subit des changements physiologiques et phénotypiques résultants de son adaptation au milieu intracellulaire (Faulkner *et al.*, 2002; Fernandez-Moreira *et al.*, 2006; Miyake *et al.*, 2006) : les légionelles, disposant de nutriments en quantité suffisante, se multiplient activement (Figure II-5). L'épuisement de nutriments conduit à l'arrêt de la phase de répliation. Les bactéries se différencient alors en une « forme mature intracellulaire » flagellée ou MIF (Mature Intracellular Form, voir Tableau II-9 (Byrne *et al.*, 1998; Greub *et al.*, 2003)) qui est la forme de dissémination de la bactérie (Figure II-4) (Garduno *et al.*, 2002). Après mort nécrotique du protozoaire hôte, les légionelles sont libérées dans l'environnement. Il a par ailleurs été démontré que *L. pneumophila* pouvait se maintenir dans l'amibe pendant l'enkystement, ce qui permet à la bactérie de résister à de nombreux stress et notamment aux traitements biocides.

Tableau II-9. Principaux caractères phénotypiques permettant de différencier les formes répliquatives et transmissives de *L. pneumophila* (Fields *et al.*, 2002; Molofsky *et al.*, 2004).

Phénotype	Phase répliquative	Phase transmissive
Motilité	-	+
Résistance aux stress	-	+
Production de pigment	-	+
Granules de stockage (β -hydroxybutyrate)	-	+
Sensibilité au sodium	-	+
Paroi	Irrégulière	Lisse
Forme	Bacilles	Petites cellules cocco-bacillaires

II.2.3.2.2 Association avec le biofilm

Les réseaux d'eau colonisés par *L. pneumophila* sont sources de contamination par la bactérie. Or l'eau des réseaux constitue un milieu oligotrophe, théoriquement peu favorable au développement bactérien. Ainsi, les micro-organismes ont tendance à adhérer aux surfaces, où se concentrent les nutriments, et à former des biofilms capables d'exploiter cette ressource. La première démonstration de la persistance de *L. pneumophila* sous forme de biofilm a été effectuée par Wright *et al.* (1989). Dans cette étude, les auteurs montrent que *L. pneumophila* est préférentiellement isolée à la surface des canalisations plutôt qu'en suspension dans l'eau du réseau. Ils ont également observé, *in vitro*, l'adhésion de ces bactéries à de nombreux matériaux : fonte, acier galvanisé, cuivre, PVC, bois. Cette étude suggère le rôle important du biofilm dans la persistance des légionelles dans tous types de réseaux d'eau (cuivre, polyéthylène (Walker *et al.*, 1993), PVC, acier classique ou INOX, polypropylène (Rogers *et al.*, 1994)). Le biofilm offre notamment une niche de protection contre les biocides (Cargill *et al.*, 1992; Giau *et al.*, 2009).

L. pneumophila emploie différents moyens pour se maintenir au sein d'un biofilm. Tout d'abord, les biofilms servent souvent de substrat nutritif pour le développement des protozoaires ou amibes qui peuvent coloniser les réseaux d'eau. Comme le mentionne le chapitre précédent, *L. pneumophila* a la capacité de se multiplier à l'intérieur de ces cellules.

Ainsi, si *L. pneumophila* peut se maintenir pendant de longues périodes (jusqu'à 15 jours) dans certains biofilms artificiels et en milieu oligotrophe, sa multiplication est induite lors de l'ajout d'amibes (Murga *et al.*, 2001; Kuiper *et al.*, 2004; Declerck *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2009). En pratique, les auteurs constatent que la présence de légionelles dans une eau est souvent corrélée à la présence d'amibes (Lasheras *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2006).

La réplication extracellulaire de *L. pneumophila* au sein du biofilm est encore controversée (Declerck, 2009). Cependant, de nombreuses études offrent des arguments en faveur de ce phénomène.

Le biofilm est un écosystème au sein duquel les micro-organismes créent des interactions métaboliques (Donlan, 2002). Ainsi, certaines bactéries, dont *L. pneumophila*, ont la capacité de se multiplier grâce aux produits extracellulaires issus d'autres micro-organismes. La croissance de *L. pneumophila* est par exemple favorisée par des cyanobactéries, des algues (Tison *et al.*, 1980; Lau *et al.*, 2009) ou par des bactéries comme *Flavobacterium breve*, *Pseudomonas spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Acinetobacter spp.* (Guerrieri *et al.*, 2008; Lau *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2009). Les micro-organismes morts ou en décomposition dans le biofilm représentent également une source de nutriments. Récemment, Temmerman *et al.* (2006) ont démontré que *L. pneumophila* était capable de se développer dans de l'eau potable stérile contenant des bactéries à Gram négatif inactivées par la chaleur (*P. putida*, *E. coli*). Enfin, contrairement à d'autres micro-organismes endoparasites obligatoires comme *Coxiella burnetii* ou *Chlamydia pneumoniae*, *L. pneumophila* peut se développer sur un milieu de culture complexe de manière extracellulaire. Il se pourrait donc que *L. pneumophila* ait aussi la capacité de se multiplier de manière extracellulaire dans l'environnement (Taylor *et al.*, 2009).

Dans les réseaux d'eau, le biofilm est donc un réservoir important de *L. pneumophila*, ce qui implique des opérations de nettoyage et de désinfection appropriées afin d'éviter toute contamination ou prolifération anormale.

II.2.3.3 Pathologie et risque infectieux

II.2.3.3.1 Pathologie

Les données épidémiologiques indiquent que *Legionella* est un micro-organisme opportuniste à l'origine de trois formes cliniques : la fièvre de Pontiac, la maladie du Légionnaire et des

formes extra-pulmonaires. Une forme asymptomatique a aussi été décrite, dans laquelle la sérologie seule est positive. La maladie se déclare le plus souvent après inhalation d'aérosols contaminés (Deloge-Abarkan *et al.*, 2007), même si l'infection par la flore oro-pharyngée a été parfois suspectée (intubations, noyades (Jarraud *et al.*, 2002)).

La fièvre de Pontiac est une maladie bénigne, sans atteinte pulmonaire. Les patients atteints présentent un syndrome pseudo-grippal, accompagné de fortes fièvres, de céphalées, de myalgies, de frissons, parfois de vertiges et d'une sensation de malaise général. Le temps d'incubation est de 1 à 2 jours et la guérison est spontanée (en 2 à 5 jours), sans séquelle (Tossa *et al.*, 2006). La maladie est souvent observée sous forme épidémique, avec un taux d'attaque (nombre de malades / nombre de personnes exposées) de 95 % à 100 %.

La maladie du Légionnaire est une maladie à déclaration obligatoire en France et qui représente 0,5 à 5 % des pneumopathies communautaires (hôtels, immeubles, spas ou encore associées à des émissions extérieures à partir de tours aéroréfrigérantes) et moins de 0,1% des infections nosocomiales en 2006 (InVS). Le taux d'attaque lors d'épidémies est faible (de 0,1 à 0,5 %) et des cas sporadiques peuvent aussi être observés. En 2001, l'incidence de cette maladie a été estimée à 1,9 cas pour 100 000 habitants par l'InVS (dont 20% d'origine nosocomiale).

La maladie du Légionnaire débute, après une période d'incubation de 2 à 5 jours, par une faible toux sèche, des myalgies, une légère fièvre, des symptômes gastro-intestinaux et parfois des épisodes de démence ou de confusion. Plus tard, la fièvre devient forte et les patients présentent une alvéolite et une bronchiolite. L'atteinte pulmonaire peut être observée par radiographie. Les régions infiltrées observées aux rayons X sont typiques d'une pneumopathie par *Legionella* (dont *L. pneumophila*), mais ne suffisent pas à établir un diagnostic précis. La mortalité de la maladie varie de 7 à 24 %, en fonction de l'âge des patients et de leur état d'immuno-dépression (Steinert *et al.*, 2002). L'insuffisance respiratoire irréversible et l'insuffisance rénale aiguë sont deux complications de la pneumopathie à *Legionella* (Jarraud *et al.*, 2002). Compte tenu des différences importantes de susceptibilité des hôtes et de la virulence variable de *Legionella*, aucune dose infectieuse n'a pu, à ce jour, être déterminée avec précision. Toutefois, à l'heure actuelle, des concentrations-seuil acceptables ont été définies : les réseaux d'eau chaudes sanitaires doivent présenter des concentrations en *L. pneumophila* inférieures à 1000 UFC/L et les secteurs à risque des établissements de santé

ainsi que les établissements thermaux, des concentrations en *Legionella* dont *L. pneumophila* inférieures au seuil de détection, soit à 50 UFC/L (Abenhaim, 2000; DGS, 2000; Houssin, 2010).

Il existe également des formes de légionelloses extrapulmonaires, le plus souvent sous forme de myocardites, de péricardites, d'endocardites (sur valve prothétique), mais aussi de péritonites, de colites nécrosantes ou de pancréatites.

II.2.3.3.1 *Épidémiologie de la maladie du Légionnaire*

L'InVS (Institut de Veille Sanitaire) récolte les données de déclaration obligatoire de la maladie du Légionnaire. L'analyse de ces données indique que l'incidence de la maladie augmente avec l'âge des patients (voir Figure II-6). Il apparaît aussi que les hommes sont plus touchés que les femmes, le ratio étant de 3 cas pour 1 (Neil *et al.*, 2008).

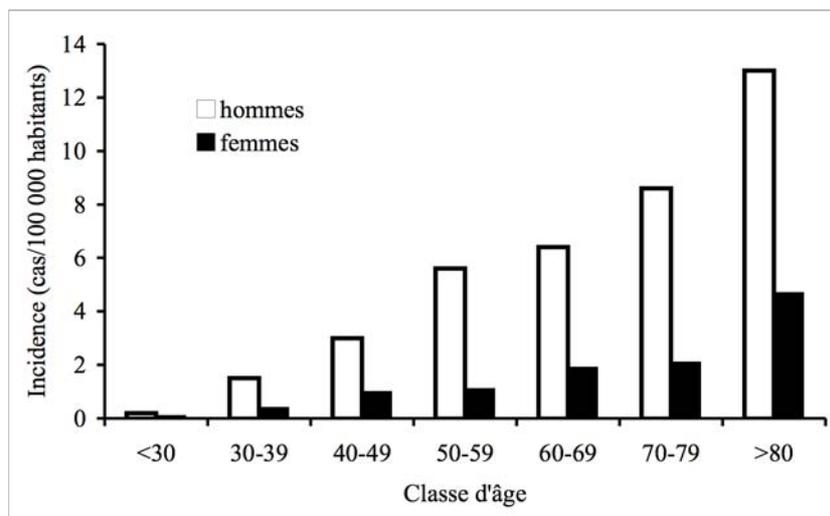


Figure II-6. Incidence de la maladie du Légionnaire en fonction de l'âge et du sexe, Centre National de Référence des Légionelles (CNR-L, 2008).

Dans 70 % des cas, les patients présentent au moins un facteur de risque. Parmi les facteurs définis (Tableau II-10), le tabagisme apparaît comme le plus fréquent (44 % des cas). D'autres facteurs sont également en cause : maladie respiratoire, cardiaque, éthylisme, immunodéficience.

Tableau II-10. Facteurs favorisant parmi les cas survenus en France en 2008 (InVS).

	Nombre	Pourcentage
Nombre total de cas	1244	100
Cancer – hémopathies	107	9
Corticoïdes – Immunosupresseurs	110	9
Diabète	183	15
Tabagisme	543	44
Autre	232	19
Au moins un facteur	860	69

Une variation du nombre de cas de légionelloses est également observée en fonction des saisons, les mois d'été affichant un taux de légionelloses nettement supérieur aux mois d'hiver. Cette saisonnalité se retrouve aussi aux États-Unis, bien que l'ouest du pays semble faire exception (Neil *et al.*, 2008) (voir Figure II-7).

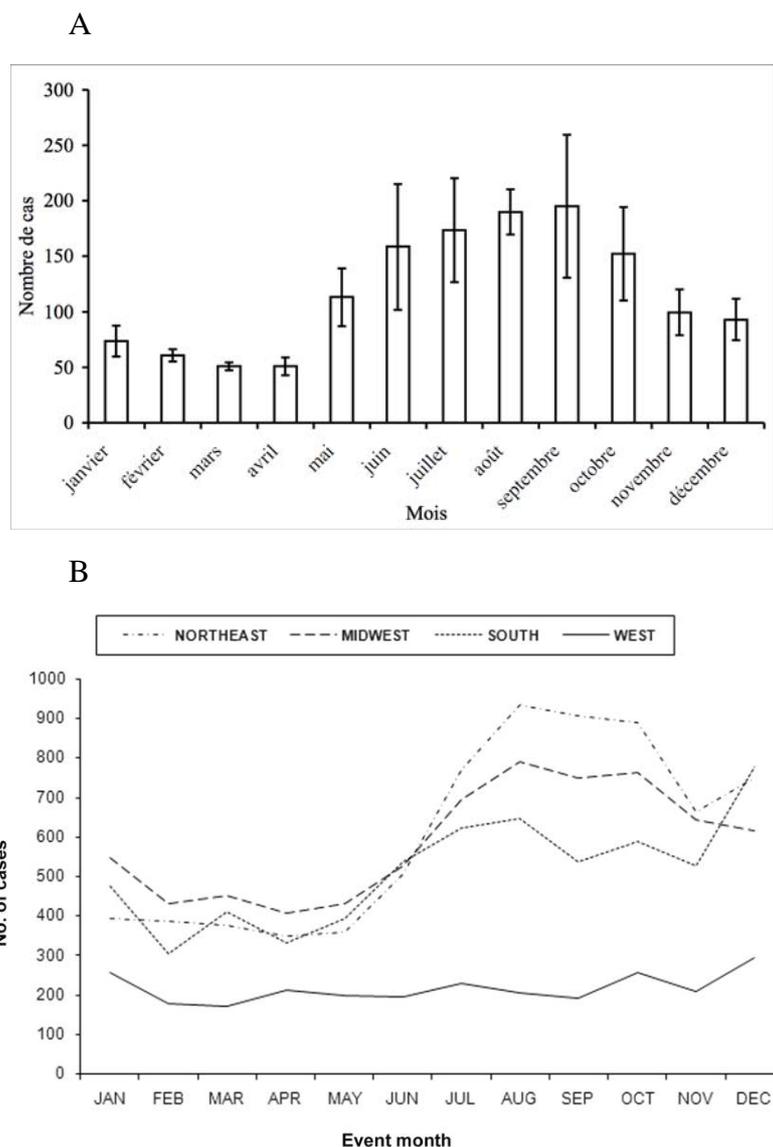


Figure II-7. A. Nombre de cas en France, en fonction du mois de l’année (moyennes \pm écarts-types). Les moyennes ont été établies sur les années 2005 à 2008, d’après les données de l’InVS résultant de Déclaration Obligatoire. B. Nombre de cas aux États-Unis en fonction du mois dans 4 régions (moyennes de 1990 à 2005) (Neil *et al.*, 2008).

II.2.3.4 Facteurs de virulence

Plusieurs modèles d’infections sont à disposition des chercheurs pour étudier les facteurs de pathogénicité lié à *L. pneumophila*. L’animal le plus susceptible à l’infection par *L. pneumophila* est le cochon d’Inde, même si la souris, le rat et le hamster peuvent aussi être utilisés. Plus récemment, d’autres modèles ont été privilégiés : *Caenorabditis elegans* et

Drosophila melanogaster (Steinert *et al.*, 2002), dont les génomes sont complètement séquencés. *In vitro*, de nombreuses lignées cellulaires permettent d'observer les aspects cellulaires et moléculaires de l'infection : des lignées macrophagiques, comme les U937 (Rankin *et al.*, 2002) ou les HL60, ou non-macrophagiques, comme les HeLa (Garduno *et al.*, 1998), Vero ou McCoy (Steinert *et al.*, 2002) et des cellules endothéliales (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) (Chiaraviglio *et al.*, 2008). Enfin, plusieurs souches de protozoaires sont susceptibles d'être colonisées par la bactérie. On peut notamment citer *Acanthamoeba castellanii* (Rowbotham, 1980), *Hartmanella vermiformis*, *Naegleria fowleri*, *Dictyostelium discoideum*, un mycétozoaire (Hagele *et al.*, 2000), et *Tetrahymena vorax*, un cilié (Taylor *et al.*, 2009).

Les facteurs de virulence de *L. pneumophila* sont listés dans le Tableau II-11.

Tableau II-11. Facteurs de virulence de *L. pneumophila* et rôles possibles (Steinert *et al.*, 2002).

Localisation	Facteur de virulence	Rôle
Surface	LPS	Variation de phases virulente/avirulente
	Protéine MOMP	Lie C3 et C3bi du système du complément Médie la phagocytose de la bactérie par liaison des récepteurs CR3 et CR1 (macrophages)
	Pili de type IV	Adhésion aux cellules de mammifères et amibiennes
	Flagelle	Augmentation de la probabilité de rencontre d'une cellule hôte
	Protéine Mip (Macrophage Infectivity Potentiator)	Survie intracellulaire dans les macrophages
	Protéine de la membrane externe de 16kDa	Adhésine potentielle

Sécrétés	Protéine Lly (pigment)	Favorise la formation d'acide homogentisique (HGA) qui s'oxyde et se polymérise en un pigment « mélanin-like » Résistance à la lumière
	Système de sécrétion de type IV (Système Dot-Icm)	Sécrétion d'effecteurs dans la cellule hôte
	Système de sécrétion de type II	Sécrétion de deux phosphatases, une RNase, une zinc-métalloprotéase, des mono-, di- et triacylglycérol-lipases, une lysophospholipase A et un p-nitrophényl phosphorylcholine hydrolase
Autres	Gène <i>pmi</i> (protozoa and macrophage infectivity)	Phagocytose Reprogrammation de la voie endosomale
	Gène <i>mil</i> (macrophage infectivity loci)	Phagocytose Reprogrammation de la voie endosomale
	Gène <i>eml</i> (early stage macrophage-induced locus)	Phagocytose Reprogrammation de la voie endosomale
	Gène <i>enh</i> (enhanced entry)	Phagocytose Reprogrammation de la voie endosomale
	Systèmes d'acquisition du fer :	
	Protéine codée par <i>frgA</i>	Homologie avec l'aérobactine synthase de <i>E. coli</i>
	Légiobactine	

Méthyltransférase (codée par *iraA*)
 Transporteur potentiel peptidique de fer (codé par *iraB*)
 Système de biogénèse du cytochrome c (*ccmC*)
 Réductases périplasmiques et cytoplasmiques de Fe³⁺
 Gène de biosynthèse de l'hydroxymate
 Sidérophore « pyoverdine-like »

Le lipopolysaccharide (LPS) de *L. pneumophila* est l'antigène immunogène majeur de la bactérie, capable d'activer les voies classiques ou alternatives du complément. Il est à la base de la classification par sérotypage (Helbig *et al.*, 1997). Le LPS de *L. pneumophila* du séro groupe 1 (souche Philadelphia) diffère de celui des autres bactéries à Gram négatif dans la composition de son lipide A, constitué d'acides gras à longues chaînes (voir Figure II-8). La chaîne O-spécifique est composée d'homopolymères d'acide légionaminique, très hydrophobe (Luneberg *et al.*, 1998). Ce LPS présente la particularité de contenir un épitope lié à la virulence de la souche (méthylation de l'acide légionaminique) et son expression est liée à un plasmide instable, probablement d'origine phagique. Chez une souche sauvage, virulente, le plasmide est chromosomique tandis que chez une souche avirulente le plasmide est excisé (Luneberg *et al.*, 2001).

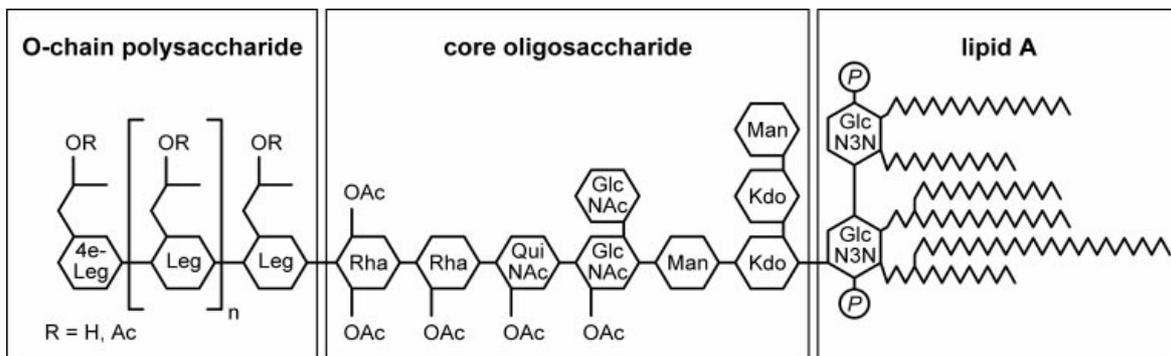


Figure II-8. Structure du LPS de *L. pneumophila* séro groupe 1 (Kooistra *et al.*, 2002).

Les autres structures de surface (pili de type IV, MOMP) sont impliquées dans l'adhésion aux cellules ou le déplacement (flagelle).

L. pneumophila possède de nombreux systèmes de sécrétion pour le transport de molécules à travers la membrane externe : le système de type II, Lsp, le système de type IVB, Icm/Dot, et le système de type IVA, Lvh. Deux systèmes putatifs ont également été identifiés : le système de type I, Lss et un système de type V, identifié chez la souche Paris (De Buck *et al.*, 2007) :

- Le système de sécrétion de type I est un système permettant le transport de protéines à travers les 2 membranes en une seule étape. Pour le moment, aucun substrat n'a été identifié.
- Le système de sécrétion de type II de *L. pneumophila* est impliqué dans la croissance et la survie de la bactérie à basse température, dans les amibes et dans les macrophages. Les protéines sécrétées sont d'abord transloquées à travers la membrane interne puis dans le périplasme. Un pseudopilus pousse ensuite les protéines à travers un pore de la membrane externe (sécrétine). Vingt-cinq protéines peuvent être sécrétées via ce système, dont des métalloprotéases, des phosphatases, une chitinase (DebRoy *et al.*, 2006) et une endoglucanase (Pearce *et al.*, 2009).
- Deux systèmes de sécrétion de type IV co-existent chez *L. pneumophila* : un système de type IVA, le système Lvh (*Legionella vir* homologues), proche du système Vir de *Agrobacterium tumefaciens* et un système de type IVB, le système Icm/Dot (Intracellular multiplication/Defective organelle trafficking).

Le système de type IVA est nécessaire pour l'infection de la cellule hôte ainsi que la croissance à 30 °C, ce qui suggère un rôle dans la survie dans l'environnement (De Buck *et al.*, 2007). Son rôle dans la pathogénicité des souches de *L. pneumophila* est souligné par l'étude de Samrakandi *et al.* (2002) qui montre que les gènes *lvh* sont mieux représentés dans les isolats cliniques que chez les souches environnementales.

Le système de sécrétion Icm/Dot joue un rôle primordial dans la virulence de *L. pneumophila*. Composé de 25 gènes, il est impliqué dans des phénomènes variés :

phagocytose par les macrophages et formation de pores dans la membrane de la cellule hôte pour la translocation de protéines effectrices chez l'hôte. Les protéines effectrices permettent l'inhibition de la fusion du phagosome et du lysosome pour former une niche de réplication bactérienne. Autour du phagosome sont également recrutés des vésicules et le réticulum endoplasmique granuleux de l'hôte *via* les facteurs sécrétés par Icm/Dot. Enfin, certaines protéines sont impliquées dans la libération des bactéries puisqu'elles permettent l'induction de l'apoptose dépendante des caspases 3 dans des cellules de mammifères et la formation de pores d'« évacuation » (cytolysine) dans la membrane des cellules hôtes, après l'étape de réplication (Segal *et al.*, 2005).

Pour terminer, *L. pneumophila* a d'importants besoins en fer pour sa croissance extra- ou intracellulaire, qui lui sert de cofacteurs pour des enzymes, dont une superoxyde dismutase (Hickey *et al.*, 1997). Elle dispose donc de nombreux facteurs d'acquisition du fer, comme le décrit le Tableau II-11.

II.2.3.5 Sensibilité aux molécules antimicrobiennes

II.2.3.5.1 Antibiotiques

Les modèles d'évaluation de la sensibilité de *L. pneumophila* aux antibiotiques sont peu corrélés avec les données épidémiologiques disponibles. Ces modèles permettent en effet de mesurer l'effet des antimicrobiens sur des bactéries extracellulaires, alors que lors de l'infection, les bactéries sont protégées à l'intérieur des macrophages (Pedro-Botet *et al.*, 2006). Ce sont donc des antibiotiques capables d'atteindre des CMI intracellulaires « efficaces » qui sont à privilégier dans le traitements des légionelloses, notamment les macrolides (kétolides et azalides ; bactériostatiques) – inhibiteurs de la synthèse protéique par fixation sur la sous-unité 50S ribosomale – et les fluoroquinolones (bactéricides) – inhibiteurs de la synthèse d'ADN par fixation sur l'ADN-gyrase. La rifampicine est également utilisable, mais jamais en monothérapie.

L'érythromycine a longtemps été le traitement de référence, mais l'azithromycine et la clarithromycine, ayant une meilleure activité intracellulaire, sont de plus en plus privilégiées. Les fluoroquinolones, dont l'activité intracellulaire est supérieure à celle des macrolides, semble permettre une meilleure réponse thérapeutique (Pedro-Botet *et al.*, 2006). L'association d'une fluoroquinolone (notamment la lévofloxacine) à un macrolide est utilisée

pour le traitement de légionelloses sévères ou touchant des patients immunodéprimés (Jarraud *et al.*, 2002).

Aucun mécanisme de résistance spécifique n'a été identifié pour ces antibiotiques, mais on note tout de même des échecs thérapeutiques (Jarraud *et al.*, 2002), le plus souvent liés à l'administration tardive du traitement et à la gravité de l'infection. Des systèmes de résistance naturels ont également été décrits, notamment le système AcrA-like / AcrB-like / TolC, appartenant à la famille des RND. La mutation de la protéine TolC chez *L. pneumophila* (souche Lens) a permis de caractériser l'origine de résistances à l'érythromycine, la novobiocine et la norfloxacine (Ferhat *et al.*, 2009).

II.2.3.5.1 Désinfectants

La revue de Kim *et al.* (2002) dresse une liste exhaustive des désinfectants étudiés dans la littérature contre une contamination par *L. pneumophila*. Le Tableau II-12 présente les traitements actifs.

Tableau II-12. Désinfectants considérés actifs contre *L. pneumophila* (Kim *et al.*, 2002).

Type de désinfectant	Désinfectant
Métaux	Cu ⁺⁺ et Ag ⁺⁺
	Cu ⁺⁺
Agents oxydants	Chlore
	Brome
	Dioxyde de chlore
	Monochloramine
	BCDMH (Hydantoïne halogénée)
	Ozone

Type de désinfectant	Désinfectant
Agents non oxydants	Kathon (isothiazolone)
	BIT (isothiazolone)
	PHMB
	DBNPA (amide halogéné)
	Bronopol (glycol halogéné)
	Ammoniums quaternaires
	Glutaraldéhyde

Même si des traitements variés sont disponibles, la littérature décrit de nombreux échecs de désinfection qui se caractérisent en général par des recontaminations plus ou moins tardives de l'eau du réseau (Thomas *et al.*, 2004). Deux causes principales sont évoquées pour expliquer ces échecs.

Comme le décrit le chapitre II.2.3.2.1, *L. pneumophila* est une bactérie à développement intracellulaire qui a la capacité de se multiplier à l'intérieur d'amibes. À l'intérieur de ces cellules, les bactéries sont protégées de certains stress, dont certains biocides vis-à-vis desquels les amibes sont résistantes. Les bactéries libérées ont, en outre, une résistance supérieure aux bactéries cultivées sur géloses : elles sont moins sensibles aux variations de températures, de pH, d'osmolarité et à l'exposition aux biocides (Abu Kwaik *et al.*, 1998). Les amibes ont pour particularité de s'enkyster lorsque les conditions environnementales sont défavorables. Or, *L. pneumophila* peut persister à l'intérieur des formes enkystées, ce qui lui permet de résister à des concentrations en chlore atteignant 50 ppm (Kim *et al.*, 2002).

La deuxième cause évoquée pour expliquer la résistance de *L. pneumophila* aux traitements est la colonisation des biofilms qui se mettent en place dans les réseaux de canalisations d'eau. Peu d'études concernent le rôle de biofilms ne contenant pas d'amibes dans la protection de la bactérie. Il a tout de même été démontré que des bactéries sessiles sont plus de 100 fois plus résistantes à l'iode que des bactéries planctoniques (Kim *et al.*, 2002). De la même manière, Cooper *et al.* (2009) ont observé que des biofilms mono-espèces de *L. pneumophila* formés dans un milieu de culture riche avaient pu continuer à croître malgré un choc chloré de 50 ppm pendant 1 h. Comme dans le cas de *P. aeruginosa*, le biofilm semble donc jouer un rôle important dans la persistance de *L.pneumophila* dans un réseau.

L. pneumophila est un bacille à Gram négatif hydrotellurique souvent isolé dans des milieux humides naturels et qui colonise également des écosystèmes artificiels tels que les réseaux d'eaux, les tours aérorefrigérantes et les systèmes de climatisation.

Sa capacité à se répliquer à l'intérieur d'unicellulaires phagocytaires dans l'environnement (amibes) est très vraisemblablement à l'origine de sa pathogénicité chez l'homme (multiplication à l'intérieur des macrophages pulmonaires). L'infection se manifeste soit par une fièvre bénigne à guérison spontanée, soit par une pneumopathie sévère dont la mortalité varie entre 7 et 24 %. La majorité des facteurs de virulence exprimés par cette bactérie sont impliqués dans le développement intracellulaire, notamment dans les macrophages pulmonaires.

L. pneumophila est une bactérie à croissance fastidieuse et sa présence fréquente dans les réseaux d'eau, milieux oligotrophes est donc difficile à interpréter. La présence d'autres micro-organismes (protozoaires ou bactériens), notamment sous forme de biofilms, est souvent considérée comme un facteur de prévalence de la bactérie dans les réseaux d'eau. D'autre part, la sensibilité de *L. pneumophila* vis-à-vis de biocides est grandement diminuée au sein du biofilm.

Comme pour *P. aeruginosa*, le biofilm joue donc un rôle clef dans la persistance de *L. pneumophila* dans les réseaux. L'objet du prochain chapitre est de faire l'état des connaissances concernant le biofilm afin d'en déduire les moyens disponibles pour limiter sa présence dans les réseaux d'EMN.

II.2.4 *Le biofilm*

II.2.4.1 *Définition*

Les biofilms se définissent comme l'association d'une communauté bactérienne à une surface, incluse dans une matrice extracellulaire polymérique. Dans la nature, la matrice du biofilm renferme la plupart du temps des éléments divers : minéraux, particules d'argile etc. Costerton *et al.* (1995) ont élargi cette définition à des systèmes microbiens non associés à des surfaces, des agrégats ou floculats, seulement caractérisés par une adhésion interbactérienne. Le biofilm peut adopter des architectures variées (monocouche, microcanaux, microcolonies de type « mushrooms »...) qui résultent du type d'espèces microbiennes le colonisant et des conditions de culture (milieu environnant, surface, flux...).

Il semblerait que ce mode d'existence particulier soit le mode de croissance prédominant pour la plupart des espèces microbiennes (Palmer *et al.*, 2007). Ce fait peut être expliqué par les nombreux avantages de ce mode de vie :

- Disponibilité en nutriments à proximité des surfaces : il a été démontré que les surfaces accumulaient de nombreuses molécules organiques et composés minéraux qui servent de substrats nutritionnels au développement microbien. Les surfaces elles-mêmes peuvent représenter une source de nutriments pour les micro-organismes ;
- Proximité de différentes cellules de la même espèce ou d'espèces différentes qui augmente la probabilité des transferts génétiques horizontaux et la coopération cellulaire ;
- Protection vis-à-vis de conditions environnementales défavorables : l'homéostasie créée par les cellules permet aux bactéries de résister à de nombreux stress comme l'exposition aux UV, la température, la dessiccation, des concentrations élevées en métaux lourds, biocides, ou, dans le cas d'espèces pathogènes, au système immunitaire de l'hôte. Il semblerait que la matrice extracellulaire joue un rôle protecteur important.
- Modifications d'expression génique et donc phénotypiques : ces modifications concernent notamment le taux de croissance, la structure pariétale (modification d'expression des porines chez les bactéries à Gram négatif...) (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

L'utilisation de techniques combinant biologie moléculaire et microscopie a permis de mettre

en évidence un état physiologique particulier des cellules en biofilm, fondamentalement différent du mode de vie planctonique (cellules en suspension dans un milieu, « nageuses ») : le biofilm ne représente pas un simple assemblage de cellules déposées sur une surface, mais un système dynamique et structuré. Le cycle de mise en place d'un biofilm est représenté par 3 étapes majeures : l'adhésion des cellules au support, la maturation du biofilm qui correspond à la croissance cellulaire et la mise en place d'une architecture particulière avec production de la matrice d'exopolymères, puis une phase de détachement cellulaire permettant la colonisation de nouvelles surfaces (Figure II-9). Ce cycle de formation sera détaillé dans les prochains paragraphes.

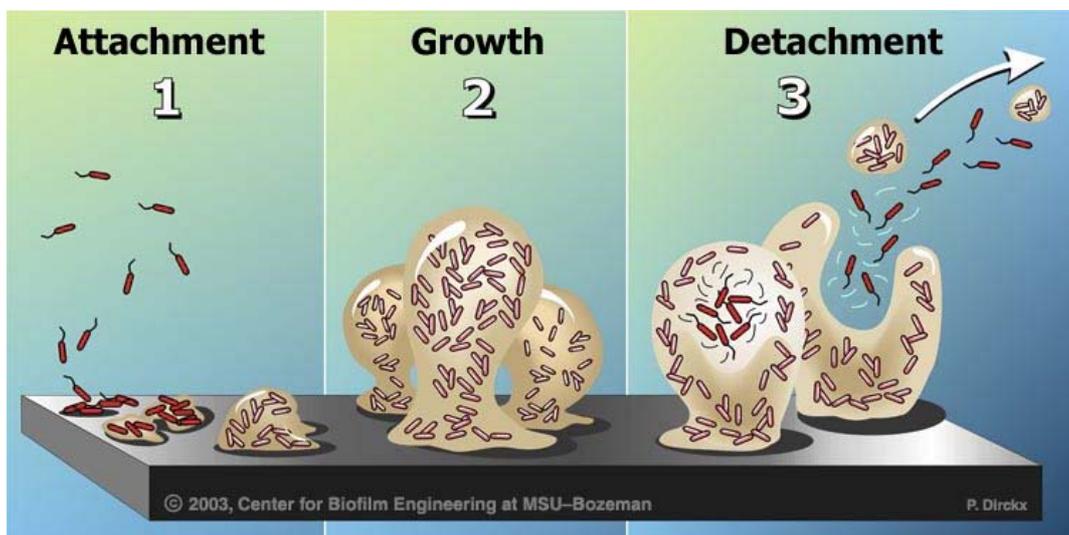


Figure II-9. Séquence de développement du biofilm en trois phases : étape d'adhésion au support, étape de croissance (développement de microcolonies et synthèse de la matrice) et étape de détachement des cellules et retour à l'état planctonique. (Center for Biofilm Engineering, Bozeman, Montana, ÉU, 2003)

L'importance des biofilms dans les réseaux d'eau est aujourd'hui communément admise. La littérature tend à montrer que la croissance de bactéries dans la phase planctonique d'un réseau de distribution est négligeable, que cette eau contienne ou non un désinfectant résiduel (Block, 1992). En réalité, la majeure partie des micro-organismes en suspension provient de la libération de cellules du biofilm. Dans un réseau, le biofilm est à l'origine de nombreux problèmes d'ordre sanitaire :

- Constitution d'une chaîne trophique à partir des micro-organismes adhérents aux surfaces pouvant aboutir au développement d'organismes indésirables, comme de

petits invertébrés ;

- Dégradation des paramètres organoleptiques (turbidité, odeur, coloration) ;
- Dégradation des surfaces d'adhésion par phénomène de biocorrosion ;
- Libération continue de micro-organismes et notamment de bactéries indicatrices de contamination (entérocoques, coliformes, *Clostridia*), pathogènes opportunistes ou non (*P. aeruginosa*, *L. pneumophila*, coliformes, *Campylobacter sp...*) entraînant le non-respect des critères de potabilité (Buswell *et al.*, 1998; Borella *et al.*, 2005).

II.2.4.2 Étape d'adhésion

L'étape d'adhésion peut être divisée en quatre sous-étapes qui sont représentées dans la Figure II-10.

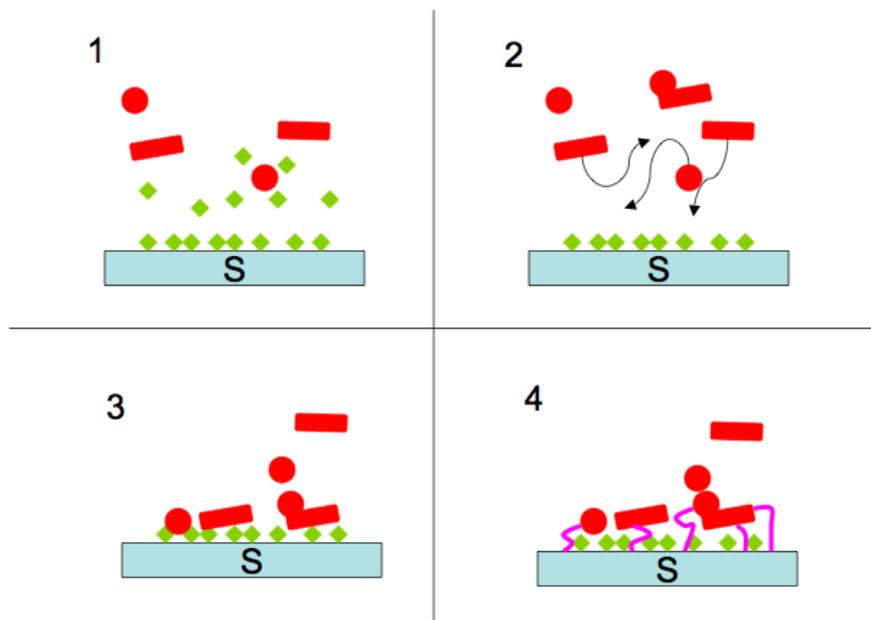


Figure II-10. Étapes d'adhésion de bactéries (en rouge) à une surface (S, en bleu). (1) Dépôt du film conditionnant (en vert) sur la surface. (2) Les bactéries en mouvement sont transférées vers la surface et co-agrégées. (3) Adhésion réversible des bactéries à la surface conditionnée par le biais de forces physico-chimiques notamment. (4) Adhésion irréversible des bactéries à la surface par la mise en jeu de mécanismes biologiques.

Adapté de Bos *et al.* (1999).

II.2.4.2.1 *Mise en place du film conditionnant*

Tout matériau immergé dans un milieu aqueux devient quasi-immédiatement recouvert de polymères provenant de ce milieu (Donlan, 2002). Les molécules polymériques, organiques ou inorganiques sont attirées vers les surfaces desquelles elles s'approchent, formant le film conditionnant. Ce film se dépose en l'espace de quelques minutes et peut se développer tant sur des surfaces biologiques (dents) qu'artificielles (cathéters, réseaux d'eau). Il peut être constitué de glycoprotéines, phosphoprotéines, albumines, lipides...

Le film conditionnant est requis pour l'adhésion des bactéries sur une surface (Palmer *et al.*, 2007). Même si son rôle est parfois discuté (les protéines déposées sur une surface pourraient diminuer le nombre de sites d'attachement disponibles pour les bactéries), la majorité des auteurs pensent qu'il représente une source de nutriments non négligeable pour les micro-organismes qui auraient donc tendance à se rapprocher des surfaces par chimiotactisme pour exploiter cette ressource. D'autre part, ces molécules adsorbées peuvent modifier les propriétés physico-chimiques de la surface (charge électrique, hydrophobicité), favorisant ainsi l'adhésion bactérienne.

II.2.4.2.2 *Transfert des bactéries vers le support*

Le transfert des bactéries vers le support fait intervenir des phénomènes de nature physico-chimique et biologique.

Les facteurs physiques sont représentés par :

- les mouvements browniens ou transport diffusif ;
- la sédimentation, qui se produit par différence de gravité entre la bactérie et le fluide dans laquelle elle se trouve ;
- le transport convectif, dû à l'écoulement. Le transport convectif semble être particulièrement important pour l'attachement des bactéries. Un régime d'écoulement turbulent favoriserait l'adhésion en augmentant la probabilité de la rencontre entre la bactérie et une surface.

La chimiotaxie est le facteur biologique prédominant dans la phase de transfert des bactéries

vers leur support. Ce système permet à la bactérie de reconnaître dans son environnement des substances chimiques attractives (nutriments par exemple) ou répulsives et d'orienter son déplacement sur de courtes distances. Dans un premier temps, les substances attractives ou répulsives se lient à des chimiorécepteurs à la surface des bactéries. Un système à 2 composants (une histidine-kinase, CheA, et un régulateur, CheY), universel à toutes les bactéries, permet ensuite la transduction du signal notamment vers le moteur flagellaire. L'activité flagellaire est ainsi modifiée (changement du sens de rotation du flagelle par exemple) de manière à orienter le déplacement bactérien vers les zones favorables (Pratt *et al.*, 1998). Ce phénomène a été confirmé par l'étude de O'Toole et Kolter (1998). Les auteurs ont constaté qu'un mutant non-motile de *P. aeruginosa* (PA14), doté d'un flagelle incomplet, était incapable de former une couche de cellules sur PVC, en milieu minimum (M63 supplémenté en glucose et casamino-acides), contrairement à la souche sauvage non mutée. Les auteurs imputent cette déficience à l'incapacité de la souche à se déplacer vers le support.

II.2.4.2.3 Adhésion réversible

L'étape d'adhésion réversible résulte de l'interaction entre les bactéries et un substrat solide pour des distances globalement inférieures à 50 nm. Durant cette étape préliminaire de la formation du biofilm, les bactéries subissent toujours des mouvements browniens et sont facilement détachables, « éloignables », par exemple par des forces de cisaillement induites par la circulation d'un fluide. C'est d'ailleurs ce dernier paramètre qui permet de différencier la phase d'adhésion réversible de la phase d'adhésion irréversible. En phase d'adhésion irréversible, les forces nécessaires au détachement des cellules sont plus importantes (grattage, nettoyages chimiques, ultrasons) (Palmer *et al.*, 2007).

Plusieurs approches physico-chimiques ont été utilisées pour décrire la phase d'adhésion réversible des bactéries à une surface, ou de bactéries entre elles.

- La théorie DLVO classique (de Derjaguin, Landau, Verwey, et Overbeek) est une théorie issue de la physique, concernant la stabilité des colloïdes, qui a été transposée pour expliquer l'adhésion de bactéries aux surfaces. Cette théorie décrit l'équilibre entre les forces de Lifshitz-van der Waals (attractives) et les forces électrostatiques (attractives ou répulsives) d'un système. Dans le cas d'un système d'interaction micro-organisme/substrat solide/liquide, ces forces sont représentées par les potentiels de surface zêta (ζ) des

bactéries ou des substrats auxquels elles adhèrent. Elle peut être représentée par l'équation :

$$G^{TOT} = G^{LW} + G^{EL}$$

où G^{TOT} est l'énergie d'interaction totale,

G^{LW} l'énergie d'interaction des forces de Lifshitz-van der Waals et

G^{EL} l'énergie d'interaction des forces électrostatiques (Bos *et al.*, 1999).

Les interactions électrostatiques peuvent varier en fonction de la force ionique d'un milieu. Ainsi, la présence de cations (surfaces cellulaires, supports) favorise l'étape d'adhésion entre surfaces chargées négativement (Hermansson, 1999).

- Dans l'approche thermodynamique, les énergies libres de surface de tous les éléments du système (bactéries / substrat solide / liquide, Figure II-11) interviennent selon l'équation suivante :

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{sm} - \gamma_{sl} - \gamma_{ml}$$

où γ_{sm} est l'énergie libre substrat-micro-organisme,

γ_{sl} l'énergie libre substrat-liquide et

γ_{ml} l'énergie libre micro-organisme-liquide.

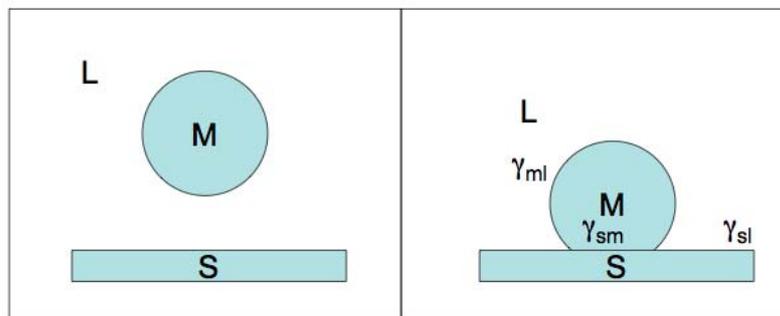


Figure II-11. Système d'interaction

micro-organisme (M) / substrat solide (S) / liquide (L) (Bos *et al.*, 1999).

Les énergies libres se calculent selon les angles de contact (donc l'hydrophobicité des surfaces). Comme tout système, le système des surfaces en interaction évolue dans le but d'atteindre une énergie libre minimale. Ainsi, selon cette théorie, l'adhésion microbienne est favorisée lorsque $\Delta G_{adh} < 0$. Toutefois, cette approche néglige les forces d'interactions électrostatiques (Bos *et al.*, 1999).

- Plus récemment, la théorie DLVO étendue a été développée (VanOss *et al.*, 1986). Plus complète que les 2 premières théories, elle prend en compte les interactions de Lifshitz-van der Waals, des interactions électrostatiques, des interactions acides-bases de Lewis, et du mouvement brownien. Cette théorie peut être considérée comme une combinaison des théories thermodynamique et DLVO classique. D'autres interactions, comme les interactions stériques, peuvent également être prises en compte pour modéliser l'adhésion des cellules à une surface.

Malgré l'intérêt évident de ces théories pour la compréhension des mécanismes d'adhésion, il est nécessaire de rappeler que ces approches sont des modèles physico-chimiques, adaptés à l'étude de l'adsorption de particules colloïdales inertes et bien définies (formes, charges, etc.). L'adhésion de cellules bactériennes, du domaine du vivant, fait également intervenir des paramètres biologiques (pili, polysaccharides, flagelles) qui ne sont pas pris en compte par ces théories (Hermansson, 1999).

D'autre part, ces modèles prennent l'hypothèse d'une surface microbienne uniforme. Or les propriétés physico-chimiques d'une surface cellulaire varient localement. Par exemple, lorsque des cellules de *Caulobacter maris* sont mises en présence de microsphères hydrophobes, ces microsphères adhèrent seulement à la partie distale du pédicule (extension de la cellule impliquée dans l'adhésion) et au flagelle, seules zones hydrophobes de la surface cellulaire.

II.2.4.2.4 Adhésion irréversible

Cette dernière étape de l'adhésion correspond à l'ancrage des bactéries sur la surface colonisée et se met en place sur de courtes distances (1 à 1,5 nm, Figure II-10). Des systèmes de liaisons moléculaires de faible énergie, mais nombreux, entrent en jeu dans ce processus et font intervenir des molécules produites par les bactéries elles-mêmes. L'étude de la transition entre la phase d'adhésion réversible et la phase d'adhésion irréversible chez différentes bactéries révèle l'existence de plusieurs étapes.

Dans un premier temps, la proximité d'une surface est perçue par la bactérie. Chez *Vibrio cholerae* par exemple, c'est un changement du potentiel de membrane ($\Delta\psi$) qui induit le

passage entre la phase d'adhésion réversible et la phase d'adhésion irréversible. Chez cette bactérie, le moteur flagellaire, actif en phase planctonique, devient inactif lorsque la bactérie est attachée à une surface (en 2 points au moins : le flagelle et le corps de la cellule par exemple). Le flux d'ions à travers le moteur flagellaire est alors stoppé, entraînant une augmentation du potentiel membranaire (accumulation d'ions à la surface de la cellule). Cette hyperpolarisation de la membrane représenterait un signal pour la bactérie, lui indiquant la proximité d'une surface (Van Dellen *et al.*, 2008) et conduirait à l'adhésion permanente.

Dans un second temps, la synthèse de certains facteurs cellulaires est induite. Les espèces *Vibrio parahemolyticus*, *Aeromonas spp.*, *Rhodospirillum centenum* et *Azospirillum brasilense* expriment des flagelles secondaires latéraux, en plus de leur flagelle polaire, dont l'expression est induite seulement à proximité d'une surface (ou en milieu visqueux) (Merino *et al.*, 2006). Chez *P. putida*, une étude protéomique a montré que les gènes de biosynthèse de polysaccharides ou lipopolysaccharides, ainsi que des gènes impliqués dans la synthèse de fimbriae, sont induits lors des étapes précoces de formation du biofilm (Sauer *et al.*, 2001).

Chez *P. aeruginosa*, la protéine SadB joue un rôle primordial dans l'adhésion irréversible. Une mutation au niveau de cette protéine bloque le passage de la phase d'adhésion réversible à la phase d'adhésion irréversible. Caiazza *et al.* (2007) ont montré que la protéine SadB augmente la production de polysaccharides Pel et diminue le taux de changements de rotation flagellaire (entraînant la motilité par « swarming », ou déplacement sur une surface), favorisant ainsi l'adhésion irréversible.

L'étape d'adhésion irréversible peut également dépendre de facteurs préexistants chez la bactérie, comme les flagelles et les pili. Chez *E. coli* par exemple, l'adhésion bactérienne est dépendante de la présence de pili particuliers, nommés curli (Saldana *et al.*, 2009).

II.2.4.3 Prolifération et architecture du biofilm

Il s'agit de la deuxième étape de la formation du biofilm, au cours de laquelle les bactéries colonisent la surface à leur disposition. Une fois fixées, les bactéries modifient fondamentalement leur comportement, via, notamment un second messager, c-di-GMP (di-GMP cyclique), qui a la capacité d'activer ou de réprimer l'expression de gènes lorsque la bactérie se trouve à proximité d'une surface (augmentation de la production de

polysaccharides, diminution de la synthèse du flagelle, etc.).

Au cours de cette étape, les bactéries se multiplient sous forme adhérente, conduisant à la formation de microcolonies. La mise en place de la structure du biofilm est décrite dans les paragraphes suivants.

II.2.4.3.1 Architecture du biofilm et technique d'analyse

L'étude de la formation de microcolonies et de la structuration spatiale du biofilm s'est développée au cours des dernières années avec l'évolution des techniques de microscopie, et notamment de la microscopie confocale (Massol-Deya *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 1998; Allesen-Holm *et al.*, 2006). Comparée à un microscope classique, la microscopie confocale permet une focalisation sur une épaisseur très fine (point focal), de l'ordre de 0,5 à 0,7 μm selon les microscopes (contre $\approx 10 \mu\text{m}$ pour un microscope classique). Le balayage de l'objet observé à différentes profondeurs aboutit à des coupes virtuelles de l'échantillon. L'analyse de ces coupes permet la reconstitution de structures en trois dimensions. De plus, de nombreux marqueurs cellulaires fluorescents sont aujourd'hui disponibles. En plus des marqueurs aspécifiques (intercalants des acides nucléiques comme les marqueurs de type Syto, Acridine Orange, etc.), certaines méthodes permettent de détecter spécifiquement des micro-organismes : technique FISH (Declerck *et al.*, 2009), immunofluorescence, micro-organismes exprimant des protéines fluorescentes (Green Fluorescent Protein, Cyan Fluorescent Protein etc.). D'autres outils permettent de visualiser des produits du métabolisme bactérien sécrétés (polysaccharides, protéines, ADN...) pour visualiser la matrice du biofilm, ou l'activité d'une population de bactéries à l'intérieur d'un biofilm (activité respiratoire détectée par le XTT (Sule *et al.*, 2009), détection de l'activité estérasique).

La formation des microcolonies du biofilm passe d'abord par la multiplication clonale des cellules, comme le montre l'étude de Klausen *et al.* (2003). En incubant une proportion égale de *P. aeruginosa* exprimant la Cyan Fluorescent Protein (CFP) et de *P. aeruginosa* exprimant la Yellow Fluorescent Protein (YFP), on constate, dans un premier temps, le développement de microcolonies soit jaunes, soit bleues (Figure II-12) dans des biofilms jeunes, ce qui témoigne d'une multiplication orientée des cellules marquées par la CFP ou par l'YFP.

Par contre, l'observation de biofilms matures (4 jours) fait apparaître un mélange de bactéries marquées par la CFP ou l'YFP. Ce phénomène intervient après la multiplication clonale,

lorsque l'accès aux nutriments devient limité à l'intérieur d'une microcolonie. Les bactéries se déplacent alors en utilisant la motilité de surface, par le biais des pili de type IV, comme l'ont montré O'Toole & Kolter (1998) chez *P. aeruginosa*, pour coloniser les autres espaces disponibles sur un substrat ou de nouvelles microcolonies.

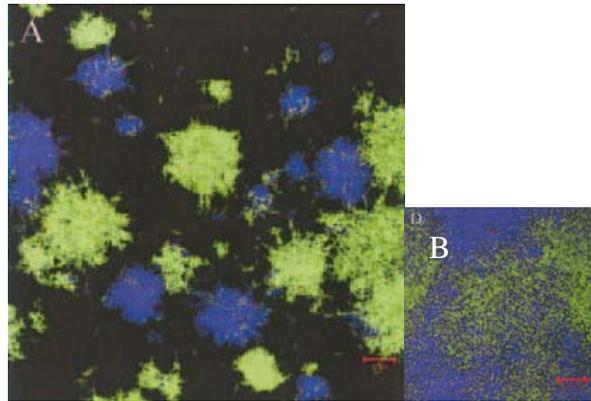


Figure II-12. Biofilm de *P. aeruginosa* (PAO1) cultivé en milieu minéral minimum, supplémenté en citrate (10 mM). A. Biofilm de 1 jour. B. Biofilm de 4 jours. En bleu, *P.aeruginosa* marqué par la CFP, en jaune, bactéries marquées par l'YFP (Klausen *et al.*, 2003). Échelle = 20 µm.

Pour maintenir un bon état physiologique des cellules du biofilm, des vides, ou canaux, doivent être ménagés autour des microcolonies. Ces canaux permettent la circulation de nutriments mais également d'eau et d'oxygène et jouent également un rôle dans l'élimination des sous-produits du métabolisme dont l'accumulation pourrait être nocive pour les bactéries (Donlan, 2002) (Figure II-13).

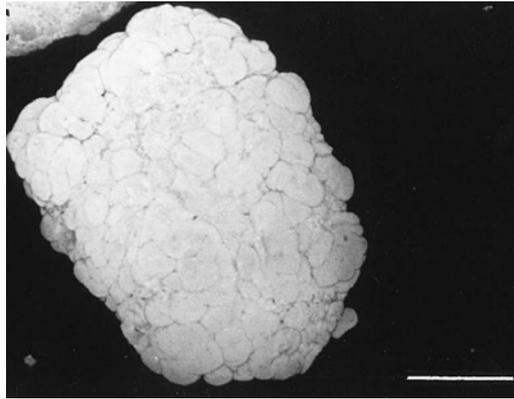


Figure II-13. Micrographie obtenue par microscopie confocale d'un biofilm multi-espèces (isolées d'un aquifère profond) développé sur une particule de charbon activé, en milieu contenant du toluène. Échelle = 500 μm . (Massol-Deya *et al.*, 1995)

L'utilisation de la microscopie confocale en temps réel a également permis à Stoodley *et al.* (1994) d'observer la circulation de microparticules de latex fluorescentes au sein de ces microcanaux, démontrant ainsi la présence d'un flux à l'intérieur des canaux.

II.2.4.3.2 Matrice d'exopolymères

La matrice est un élément crucial du biofilm. Principalement synthétisée par les bactéries, elle joue un rôle d'échafaudage pour le maintien de la structure du biofilm, mais également un rôle protecteur pour les cellules, limitant la pénétration de molécules antimicrobiennes par exemple. Plusieurs éléments interviennent dans sa composition : les polysaccharides et les protéines, composants majoritaires, mais aussi de l'ADN extracellulaire.

II.2.4.3.2.1 Polysaccharides

Les polysaccharides sont des éléments importants de la matrice du biofilm. Dans certains biofilms, ils peuvent représenter 50 à 90 % de la matière organique (Vu *et al.*, 2009). Chez les bactéries à Gram négatif, les polysaccharides sont constitués essentiellement de molécules neutres ou polyanioniques, dont la charge est due aux acides uroniques ou aux pyruvates. Seuls quelques polysaccharides de nature polycationique ont été observés chez des bactéries à Gram positif.

La nature des polysaccharides varie selon les espèces considérées. *Gluconacetobacter xylinus* est par exemple connu pour sa production de cellulose extracellulaire. Ce polysaccharide joue également un rôle très important dans la formation de la matrice de biofilms à *Salmonella typhimurium* ou à *E. coli*.

La poly- β (1,6)-*N*-acétyl-D-glucosamine (PNAG) est un exopolysaccharide impliqué dans la cohésion du biofilm chez de nombreuses espèces à Gram négatif (*E. coli*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bordetella spp.*, *Xenorhabdus nematophila*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *Actinobacillus pleuropneumoniae*), mais aussi à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*) (Ganeshnarayan *et al.*, 2009). La PNAG constitue ainsi une nouvelle cible pour la maîtrise et l'élimination de biofilms: Lu et Collins (2007) ont par exemple modifié un phage T7 (infectant normalement *E. coli*) afin qu'il exprime DspB (dispersine B), une enzyme dégradant la PNAG. Ce phage synthétique permet alors d'éliminer 3,8 log d'UFC d'un biofilm de *E. coli* contre 1,8 log d'UFC pour un phage T7 sauvage.

Une espèce bactérienne donnée est capable de synthétiser plusieurs polysaccharides pour la « construction » de la matrice du biofilm. *P. aeruginosa* est un bon exemple puisque qu'il synthétise au moins trois types d'exopolysaccharides, les Psl, les Pel et les alginates, impliqués dans le maintien de la structure du biofilm. L'importance de ces polysaccharides varie en fonction des souches étudiées et des conditions de culture.

- Les Psl sont des polysaccharides synthétisés à partir du locus « Polysaccharide Synthesis Locus », un opéron de 15 gènes. Ils sont principalement composés de mannose, galactose, rhamnose et glucose (Byrd *et al.*, 2009) et jouent un rôle important dans l'adhésion (intercellulaire et surfacique) et dans la structuration du biofilm. Ma *et al.* (2009) ont pu démontrer, en utilisant un marquage des Psl par une lectine (MOA, *Marasmiium oreades* agglutinin) puis observations en microscopie confocale, que les Psl étaient ancrés à la surface des bactéries en un motif hélicoïdal afin de favoriser l'adhésion des cellules aux surfaces et entre elles. En effet, lorsque ces bactéries sont incubées en présence de cellulase (enzyme hydrolysant Psl), la biomasse fixée après 20 h est déstructurée et représente seulement 1 % de la biomasse d'un biofilm incubé sans cellulase. Des polysaccharides Psl ont pu être observés dans des biofilms âgés de 20 h, dans des zones non colonisées, ce qui pourrait indiquer

qu'ils sont parfois libérés de la surface bactérienne pour favoriser l'adhésion ultérieure aux surfaces.

- En milieu liquide, *P. aeruginosa* a la capacité de former des biofilms à l'interface air-liquide, aussi nommés pellicules. En étudiant les mutants d'une librairie de transposons de la souche PA14 incapables de former une pellicule à l'interface air-liquide, les chercheurs ont identifié un cluster de 7 gènes (*pel* A-G), permettant la synthèse de polysaccharides Pel, hydrophobes et riches en glucose. Moins étudiés que les Psl, leur rôle a tout de même été établi au niveau de la phase d'attachement des cellules à leur support. Ils sont également impliqués dans la maintenance de l'architecture du biofilm mature (Ryder *et al.*, 2007).
- Enfin, le polysaccharide le plus étudié chez *P. aeruginosa* est l'alginate. Il consiste en une association d'acide uronique, d'acide mannuronique et d'acide guluronique et son expression est particulièrement importante chez les souches mucoïdes. L'alginate est chargé négativement, ce qui lui permet de lier les cations, notamment le calcium, qui sert de pont entre les différents polymères d'alginate. Il s'agit donc d'un polysaccharide particulièrement important pour le maintien de la structure du biofilm (Parsek *et al.*, 2008).

Les biofilms de l'environnement, formés de plusieurs espèces, sont capables de synthétiser des polysaccharides variés venant complexifier la composition de la matrice. Récemment, de nombreuses techniques de microscopie ont permis de les visualiser *in situ*. Par exemple, en remplaçant les réactifs classiques de déshydratation par de l'éthylène glycol et du 1,2-pentanediol et en augmentant le contraste produit par le marquage des polysaccharides, Reese *et al.* (2007), ont pu observer par microscopie électronique, des polysaccharides extracellulaires de biofilms formés sur des disques d'émail dentaire. Cette méthode ne donne cependant pas d'indication sur la nature ou la composition de ces polysaccharides.

La technique la plus utilisée à l'heure actuelle pour visualiser ces exopolysaccharides *in situ* est le marquage par des lectines couplées à un fluorochrome, et observées en microscopie confocale. Grâce à des lectines présentant des affinités pour différents glycoconjugués, Lawrence *et al.* (2007) ont ainsi pu visualiser des microdomaines dans des biofilms produits en réacteurs annulaires à partir de souches issues de rivières (Figure II-14). Les auteurs ont

ainsi pu constater que la couche de polysaccharides la plus proche de la surface bactérienne contenait essentiellement des résidus galactose, glucose, mannose, de *N*-acétyl-glucosamine et des glycoprotéines ; la couche de polysaccharides intercellulaire présente des affinités pour les lectines liant spécifiquement le fucose, le mannose et le glucose ; enfin, la couche externe lie principalement des lectines ayant des affinités pour le fucose, le galactose, l'acétyl-glucosamine et ses polymères.

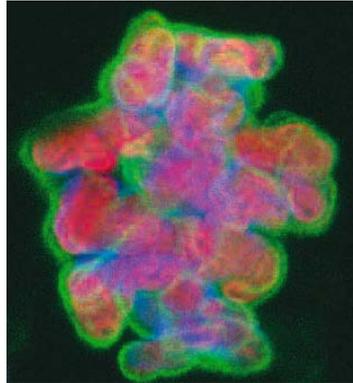


Figure II-14. Microcolonie d'un biofilm marquée par les lectines de *Triticum vulgaris* (en rouge), *Tetragonolobus purpureas* (en bleu), *Arachis hypogaeae* (en vert), faisant apparaître plusieurs microdomaines dans la matrice polysaccharidique (Lawrence *et al.*, 2007).

II.2.4.3.2.2

Protéines - Adhésines

De nombreuses protéines sont impliquées dans la formation de la matrice du biofilm.

Parmi les structures bactériennes de surface importantes dans l'adhésion et la cohésion du biofilm se trouvent les adhésines protéiques, qui regroupent différents fimbriae et des structures non-fimbriae (Latasa *et al.*, 2006) dont des structures de type fibrilles curli produites par *E. coli* (Olsen *et al.*, 1989).

Les protéines de type Bap (ou Biofilm Associated Proteins) sont des protéines de la surface cellulaire qui ont été identifiées grâce au criblage d'une banque de mutants de *Staphylococcus aureus*, incapables de former un biofilm sur polystyrène. Le gène *bap a*, par ailleurs, été identifié chez d'autres espèces bactériennes à Gram positif (*S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. hycus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*), mais aussi à Gram négatif (*P. putida*, *Salmonella enteritidis*, *Burkholderia cepacia*, *P. fluorescens*, *E. coli*,

Vibrio parahaemolyticus) (Latasa *et al.*, 2006). Chez *S. aureus*, cette protéine est impliquée dans l'adhésion initiale au support, mais augmente également la cohésion du biofilm par sa capacité à lier la PNAG.

Les curli sont des structures protéiques dont la longueur varie de 0,1 à 10 µm et la largeur de 4 à 12 nm. Ils sont principalement constitués de la protéine csgA, assemblée en une structure tertiaire de type fibrille, riche en feuillets β (Hammar *et al.*, 1995). Ce mode d'assemblage est typique des protéines fibrillaires, quelle que soit leur composition ou leur origine (exemple : protéines amyloïdes impliquées dans les maladies neurodégénératives, Pan *et al.*, 1993). Peu après la découverte de curli chez *E. coli*, des adhésines à structure amyloïde ont été décrites chez d'autres *Enterobacteriaceae* (*Salmonella typhimurium*, *Citrobacter* spp. et *Enterobacter sakazaki*) (Collinson *et al.*, 1993; Zogaj *et al.*, 2003), mais également chez des bactéries à Gram positif (*Streptomyces coelicolor*), les chaplines, ou encore chez les fungi (Gebbinck *et al.*, 2005), les hydrophobines. La détection d'adhésines amyloïdes sur des cultures bactériennes pures est basée sur la liaison du rouge Congo aux feuillets β des protéines. Les bactéries produisant des adhésines amyloïdes sont facilement identifiées par la production de colonies rouges lorsqu'elles se développent sur gélose contenant du Rouge Congo (Collinson *et al.*, 1993).

Chez *P. aeruginosa*, les pili de type IV sont impliqués dans l'architecture du biofilm. O'Toole et Kolter (1998) ont montré qu'un mutant de *P. aeruginosa* (souche PA14), était incapable de former les microcolonies typiques du biofilm formé par la souche sauvage. Plus tard, Klausen *et al.* (2003) ont montré que ces pili jouaient un rôle via la motilité par « twitching » des bactéries, qui permet une colonisation plus efficace de la surface (voir page 68).

L. pneumophila exprime également à sa surface plusieurs types de pili, notamment des pili de type IV (Liles *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 1998). Chez une souche dont le gène *pilE_L* (codant pour la piline de type IV) est muté, l'adhésion aux cellules humaines épithéliales et macrophagiques est diminuée de 50 % par rapport à la souche sauvage. Partant de ce constat, Lucas *et al.* (2006) ont émis l'hypothèse d'un rôle des pili de type IV dans l'adhésion aux biofilms. Cependant, ces auteurs n'ont pas observé de différence significative de colonisation de biofilms (contenant *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Flavobacterium* spp.) par les souches sauvage ou mutée pour le gène *pilE*.

II.2.4.3.2.3

DNA

En étudiant des biofilms de *P. aeruginosa*, Witchurch *et al.* (2002) ont pu mettre en évidence le rôle capital de l'ADN dans le maintien de la structure du biofilm. Dans cet article, les auteurs ont cultivé *P. aeruginosa* en milieu minimum, adapté à la croissance du biofilm. Un traitement à la DNase a été appliqué après 12, 36, 60 et 84 h. Les observations par microscopie confocale montrent qu'après traitement, des biofilms âgés de 12, 36, 60 h sont dissous par l'ajout de DNase, ce qui démontre l'importance de l'ADN dans la matrice. *A contrario*, des biofilms de 84 h ne sont pas affectés par la présence de DNase dans le milieu de culture, ce qui tend à montrer que d'autres composants que l'ADN interviennent tardivement dans le maintien de la structure du biofilm. La présence d'ADN dans les biofilms a également été démontrée chez d'autres espèces, dont des bactéries à Gram positif (Izano *et al.*, 2008; Mann *et al.*, 2009).

Chez *P. aeruginosa*, Allesen-Holm *et al.* (2006) ont montré que l'ADN du biofilm était similaire à l'ADN génomique de la bactérie, et donc qu'il est issu de la lyse d'une sous-population de cellules du biofilm. Toutefois, sa libération est médiée par les signaux du Quorum Sensing (voir II.2.4.3.3) et sa localisation à l'intérieur des microcolonies est spécifique, ce qui suggère une fonction essentielle au niveau de la matrice (Figure II-15).

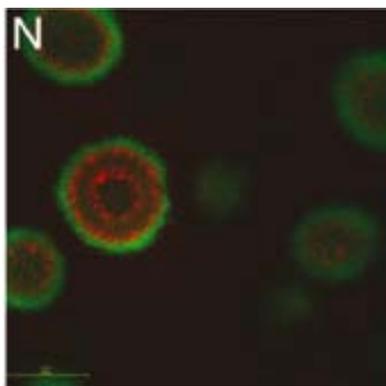


Figure II-15. Section optique à travers un biofilm de *P. aeruginosa* (PAO1) de 6 jours exprimant la GFP (en vert). L'ADN apparaît en rouge (marquage au DDAO) à l'intérieur des microcolonies (Allesen-Holm *et al.*, 2006). Échelle non précisée.

II.2.4.3.3

Quorum sensing

En tant que communauté microbienne, le biofilm représente un lieu où les bactéries

interagissent et pour ce faire, communiquent entre elles. Le phénomène de comportement communautaire, ou Quorum Sensing (QS), a été décrit pour la première fois chez l'espèce *Vibrio fischeri*, chez laquelle une substance diffusible (une acyl-homosérine lactone ou AHL) produite par les cellules elles-mêmes permet d'induire leur fluorescence. Ce mécanisme est lié à l'accroissement de la densité de la population bactérienne, qui conduit à l'augmentation de la concentration d'une molécule signal dans l'environnement extracellulaire. Quand la concentration en molécule signal atteint un niveau seuil, une cascade de transduction du signal est activée et induit l'expression, ou la répression, de gène cibles. Ce phénomène conduit donc à la modification coordonnée du comportement de toute une communauté bactérienne, appartenant ou non à la même espèce (Atkinson *et al.*, 2009).

Deux systèmes principaux de QS existent chez les bactéries, basés sur les différences du récepteur au signal : le système médié par les AHL, chez les bactéries à Gram négatif, et le système LuxR, système de transduction du signal retrouvé chez les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* notamment) et quelques bactéries à Gram négatif (*Vibrio harveyi* et *Ralstonia solanacearum*), médié par des peptides auto-inducteurs (AIP) (Zhang *et al.*, 2004).

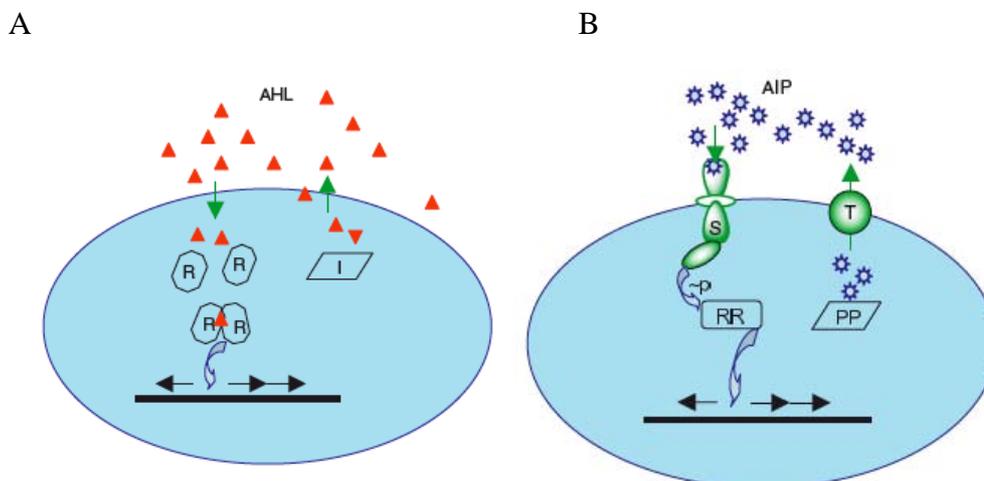


Figure II-16. A. Système de Quorum Sensing de type LuxR. La protéine LuxI (I) catalyse la production d'AHL. L'augmentation du nombre de bactéries provoque l'augmentation de la quantité d'AHL extracellulaire. La liaison de l'AHL au récepteur du signal (R) forme un complexe agissant comme un facteur de transcription. B. Système de Quorum Sensing AIP à 2 composants. Les signaux de Quorum Sensing sont détectés par un récepteur membranaire histidine-kinase et l'information est transférée aux gènes cibles par phosphorylation du régulateur de réponse (RR) (Zhang *et al.*,

2004).

Le QS est impliqué dans de nombreux phénomènes, comme la luminescence, la production d'antibiotiques, le transfert de plasmides, la motilité, la virulence mais aussi la formation de biofilms.

L'implication du QS dans la formation du biofilm a été mise en évidence pour la première fois chez *P. aeruginosa* par Davies *et al.* (1998). En mutant le gène *lasI*, responsable de la synthèse de la *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3OC12-HSL) chez la souche PAO1 de *P. aeruginosa*, les auteurs ont constaté une nette différence de structure entre le biofilm formé par la souche mutée (plat, 20 µm d'épaisseur) et la souche sauvage (formant des amas jusqu'à 80 µm de hauteur). D'autre part, la souche mutée perd sa résistance au SDS.

II.2.4.4 Détachement

Malgré les nombreux bénéfices que les bactéries tirent de l'état biofilm, le détachement de cellules est nécessaire, notamment pour la colonisation de nouvelles surfaces ou lorsque les nutriments arrivent à épuisement. Les données concernant l'étape de détachement des cellules ou d'agrégats de cellules sont encore partielles. Toutefois, Donlan (2002) évoque plusieurs paramètres intervenant dans cette phase : des phénomènes physiques d'une part, et biologiques d'autre part.

Si le détachement de « cellules filles » à partir de cellules en division dans le biofilm a été décrit, il semblerait que les forces physiques jouent un grand rôle dans la libération des cellules. Dans un réseau d'eau, le biofilm subit des forces de frottement ou de cisaillement, induites par la circulation du fluide qui, au-delà d'un certain seuil, peuvent induire plusieurs types de détachement :

- l'érosion, qui décroche régulièrement de petites portions du biofilm ;
- « l'écaillement », détachement massif et rapide de gros agrégats ;
- l'abrasion, qui résulte de la collision de particules en suspension dans le fluide avec le biofilm (Donlan, 2002).

Le détachement de cellules du biofilm chez *P. aeruginosa* est aussi régulé par des mécanismes biologiques comme l'expression d'enzymes dégradant la matrice, la lyse d'une certaine sous population de cellules ou l'activation d'un prophage (Barraud *et al.*, 2006). Plus récemment, Boles *et al.* (2008) ont mis en évidence le fait que des cellules de biofilm de *S. aureus* sont

libérées du biofilm grâce à des protéases dont l'expression est régulée par les signaux du QS (AIP).

Le détachement de cellules après ajout de surfactants, les rhamnolipides, a été décrit par Boles *et al.* (2005). Les surfactants sont des glycolipides amphipatiques qui ont la capacité d'interagir avec des surfaces et diminuent les interactions adhésives. La présence de rhamnolipides dans le milieu de culture augmente significativement la libération des cellules du biofilm, par creusement des microcolonies (Figure II-9). Chez *P. aeruginosa*, les gènes de biosynthèse des rhamnolipides sont régulés par le QS ou bien par un manque de nutriments (azote, phosphate, magnésium, calcium, potassium, sodium, fer et éléments traces). Des stress oxydatifs (ion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyde) ou nitrosatifs (oxyde nitrique, peroxydinitrite, acide nitreux, trioxyde d'azote) permettent également l'induction de la lyse et la dispersion des cellules du biofilm (Barraud *et al.*, 2006).

Le biofilm est une structure complexe, formée par des bactéries adhérentes sur une surface. La croissance bactérienne sessile, accompagnée de la production de polymères extracellulaires, conduit à la formation d'agrégats cellulaires et obéit à une séquence particulière.

Dans un premier temps, le transfert de bactéries vers la surface est suivi de la mise en place de liaisons d'origine physico-chimiques ou biologiques. Cette étape constitue les phases d'adhésion réversible puis irréversible.

La croissance des bactéries à l'intérieur des microcolonies, rapidement suivie de la synthèse d'une matrice extracellulaire, permet la formation d'une structure résistante, notamment vis-à-vis de conditions défavorables (stress, variations de pH, d'osmolarité...) et de la présence de biocides.

Enfin, la libération de cellules du biofilm permet la colonisation de nouvelles surfaces par les bactéries et marque le début d'un nouveau cycle de développement. Cette étape a également des conséquences importantes dans la dégradation de la qualité sanitaire d'une eau, via le relargage de pathogènes potentiels dans les réseaux.

Cette séquence de formation nous permet à présent de dégager les principaux moyens mis en œuvre dans les réseaux d'eau, et plus particulièrement les réseaux d'EMN, pour freiner le développement du biofilm et donc la contamination microbiologique d'une eau.

II.3 Moyens de maîtrise de la qualité microbiologique de l'EMN dans les établissements thermaux

La qualité de l'eau distribuée aux points d'usage d'un établissement thermal dépend étroitement de la qualité sanitaire du réseau d'EMN. Comme nous l'avons déjà vu, l'absence ou le mauvais entretien d'un réseau d'eau conduit à l'adhésion de bactéries et au développement d'un biofilm sur les canalisations pouvant héberger des pathogènes potentiels tels que *P. aeruginosa* ou *L. pneumophila*. Pour empêcher le développement du biofilm, il est possible d'agir sur les différentes étapes de son développement :

- **Actions sur la phase d'adhésion** : limitation de l'entrée de micro-organismes dans le réseau en maîtrisant la qualité de l'EMN à sa source et en évitant les rétro-contaminations à partir des points d'usages, réduction des possibilités de formation du biofilm dans le réseau en optimisant sa conception ou en réalisant des opérations de maintenance adaptées ;
- **Actions sur la phase de développement du biofilm** : empêcher la multiplication bactérienne par limitation de l'apport organique, maîtrise des températures, actions de nettoyage et de désinfection réguliers (réseau et points d'usage) ;
- **Actions sur les bactéries libérées du biofilm et remises en suspension** : filtration immédiate en amont du point d'usage ou irradiation par UV (soins de catégorie 3 (Solidarités, 2007)). Ce point ne sera pas développé ici.

L'ensemble de ces actions est aussi récapitulé dans le « Guide des Bonnes Pratiques Thermales » édité par le CNETh (2008).

II.3.1 Actions sur la phase d'adhésion

II.3.1.1 Inhibition du transfert des bactéries vers leur support

Un des premiers moyens d'action sur l'adhésion de bactéries aux canalisations est de limiter l'entrée de micro-organismes dans le réseau.

Dans les réseaux d'eau potable, l'addition d'un désinfectant résiduel, comme le chlore à faible concentration, permet de limiter le nombre de micro-organismes en suspension dans l'eau, et

secondairement de réduire le nombre de micro-organismes planctoniques susceptibles se fixer aux canalisations. D'après la réglementation, une EMN ne peut contenir aucun désinfectant résiduel. Ainsi, l'exploitation d'une EMN est sujette à autorisation préfectorale et des dispositions sont prises pour protéger les émergences. Les captages comportent un périmètre sanitaire d'urgence, c'est-à-dire une zone clôturée qui assure une protection sanitaire. L'exploitant de la source peut également instaurer un périmètre de protection qui vise à interdire ou réglementer les activités susceptibles de provoquer une pollution de l'eau. La contamination microbiologique est surveillée par des analyses régulières (Solidarités, 2007) visant à déterminer la concentration en micro-organismes revivifiants (dans 1 mL) à 22 et à 37 °C, l'absence de coliformes (dans 250 mL), l'absence de streptocoques fécaux (dans 250 mL), l'absence de bactéries anaérobies sporulées sulfite-réductrices (dans 100 mL) et l'absence de *P. aeruginosa* (dans 250 mL). Ces paramètres doivent rester stables tout au long de l'exploitation de l'EMN (Pöttering *et al.*, 2009).

Suite à des travaux de maintenance sur le réseau, des traitements de désinfection du réseau peuvent être effectués pour éliminer la flore introduite. Enfin, il est conseillé de disconnecter les points d'usage du réseau d'EMN afin d'éviter les rétro-contaminations.

II.3.1.2 Inhibition des phases d'adhésion réversibles et irréversibles

Malgré les moyens de protections décrits ci-dessus, une EMN contient un écosystème microbien qui peut être à l'origine de la formation d'un biofilm. Des travaux sur le réseau ou des rétro-contaminations accidentelles à partir de points d'usage peuvent aussi conduire à l'entrée de micro-organismes. La conception du réseau permet alors de limiter l'adhésion de bactéries et la formation ultérieure d'un biofilm.

II.3.1.2.1 Impact des interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques intervenant dans l'adhésion réversible des bactéries à leur support jouent un grand rôle selon la théorie DLVO. Ces interactions sont liées aux charges de surface des bactéries et des surfaces avec lesquelles elles interagissent, mesurées par le potentiel ζ (zêta).

La charge de surface d'une bactérie peut être influencée par la force ionique des solutions, par

l'âge de la culture bactérienne ou par les conditions de culture. La majorité des bactéries sont chargées négativement à pH neutre. Toutefois, des espèces ayant un potentiel zêta positif ont été observées, comme *Stenotrophomonas maltophilia*. Cette espèce a une grande capacité d'adhésion au Téflon et au verre (dont la charge de surface est négative) (Jucker *et al.*, 1996).

La force ionique du milieu dans lequel se trouve la bactérie influence sa charge de surface. Par exemple, des solutions contenant 10,5 % de chlorure de sodium inhibent l'adhésion de *Salmonella enterica* à des coupons d'INOX. L'explication donnée par Giaouris *et al.* (2005) est que la charge de surface de la bactérie est modifiée par dissociation des groupements acides (groupements carboxyl, phosphate, et amino-acides) et basiques. Le pH du milieu dans lequel se trouvent les bactéries peut également influencer la charge de surface.

Compte tenu des variations de forces ioniques en fonction des micro-organismes et de leur état, ainsi que des eaux minérales considérées, les interactions électrostatiques peuvent difficilement être maîtrisées dans un réseau d'EMN.

II.3.1.2.2 Impact de l'hydrophobicité

L'hydrophobicité d'un système joue un rôle important dans l'adhésion cellulaire selon l'approche thermodynamique. L'hydrophobicité de surface varie selon les espèces bactériennes étudiées et peut être établie par les méthodes MATH (microbial adhesion test to hydrocarbures) ou MATS (microbial adhesion test to solvants) ou la mesure de l'angle de contact (Vanhaecke *et al.*, 1990).

Différents composés des parois cellulaires sont impliqués dans l'hydrophobicité bactérienne. De nombreuses protéines de la paroi ou extracellulaires possèdent des régions hydrophobes. Oakley *et al.* (1985) ont montré que des cellules de *Streptococcus sanguis* traitées par la trypsine adhèrent plus faiblement à l'hexadécane lors d'un test MATS, probablement à cause de la libération de sites protéiques hydrophobes. Les organelles de nature protéique exposés à la surface d'une bactérie participent à l'hydrophobicité générale de la cellule (fimbriae, fibrilles). Chez les bactéries à Gram positif, l'acide lipotéichoïque (LTA) est également impliqué dans les interactions hydrophobes. L'hydrophobicité de surface des bactéries dépend donc des souches et des conditions environnementales.

La modification des propriétés d'hydrophobicité des surfaces en contact avec les bactéries (par traitement ou fonctionnalisation par exemple) permet de modifier les propriétés d'adhésion des cellules. Patel *et al.* (2003) ont par exemple montré que *Staphylococcus epidermidis* est capable d'adhérer au polyuréthane (une surface hydrophobe) et de former un biofilm. Toutefois, lorsque le polyuréthane est rendu hydrophile, l'adhésion bactérienne est fortement inhibée. Des études comparatives montrent que des matériaux hydrophobes (téflon, verre siliconé) sont généralement plus colonisables par les micro-organismes que des matériaux hydrophiles (Faille *et al.*, 2002). Ainsi, le choix des matériaux constitutifs des réseaux d'EMN peut être orienté de manière à limiter le développement du biofilm. La littérature décrit globalement des colonisations plus faibles des matériaux métalliques (acier INOX, cuivre) que des matériaux plastiques (PVC ou PE, (Rogers *et al.*, 1994; van der Kooij *et al.*, 2005; Simoes *et al.*, 2007)), même si ce phénomène n'est pas uniquement lié au critères d'hydrophobicité des matériaux utilisés (pouvoir bactéricide du cuivre par exemple).

Il faut rajouter ici que le matériau constitutif des réseaux d'EMN dépend aussi étroitement de la nature et de la minéralisation de l'eau thermale : un réseau d'INOX n'est par exemple pas envisageable pour une eau fortement chargée en NaCl.

II.3.1.2.3 Impact de l'hydrodynamique

La mise en place d'interactions entre les bactéries et une surface lors de la phase précoce d'adhésion nécessite des flux relativement faibles. En effet, même si une vitesse de flux importante permet d'augmenter la probabilité de rencontre bactéries/surface, il est généralement admis que des débits importants augmentent les forces de cisaillements et inhibent l'adhésion, notamment par décrochage des bactéries adhérees de manière réversible. Ainsi Raya *et al.* (2010) ont montré que de 0 à 5 mN/m², le nombre de cellules de *P. aeruginosa* (PAO1) adhérees après 3 h d'incubation augmente régulièrement, mais que des forces supérieures à 5 mN/m² inhibent l'adhésion. À 26 mN/m², aucune bactérie n'est détectée sur la surface étudiée.

La conception d'un réseau d'EMN doit donc être pensée pour éviter les zones où les débits sont faibles. Le réseau doit ainsi être correctement dimensionné afin de ne pas créer de zones de stagnation. Les bras morts, constitués de canalisations inutilisées dans lesquelles l'eau ne circule pas, doivent être évités. Les recommandations préconisent également d'utiliser

l'ensemble du réseau régulièrement ou bien de le vidanger lors de fermetures d'établissement ou si des zones sont inutilisées (Manuel *et al.*, 2009).

De la même manière, la rugosité modifie l'adhésion bactérienne (Donlan, 2002). Il a été démontré, par microscopie électronique ou de force atomique, que l'INOX présente des micro-crevasses qui augmentent la surface d'adhésion d'une part, et jouent, d'autre part, le rôle de niches de protection pour les micro-organismes où la vitesse du flux est diminuée. Des études ont ainsi montré qu'un INOX électropoli (lisse) retenait à sa surface moins de bactéries qu'un INOX non-traité (Perdersen, 1990; Palmer *et al.*, 2007). L'adhésion cellulaire est en outre favorisée si la taille des défauts de la surface est proche de la taille des bactéries.

II.3.2 *Inhibition de la prolifération du biofilm – détachement du biofilm formé*

Lorsque toutes les conditions au sein d'un réseau sont optimales, les bactéries adhérees entrent alors en phase de croissance. Pour éviter l'accroissement du biofilm, il est possible d'agir sur certains paramètres.

II.3.2.1 *Maîtrise des conditions trophiques*

La concentration en carbone organique assimilable (COA) d'une eau est un paramètre qui influence fortement la prolifération microbiologique. Bouteleux *et al.* (2005) ont par exemple montré que *E. coli* était capable de croître dans une EAP stérile non chlorée et supplémentée en substrat organique (algues exposées à un traitement par ozonation). Le biofilm est également affecté par la concentration en COA (Servais *et al.*, 1995). Norton *et al.* (2000) ont montré qu'un abaissement en COA par des filtres biologiquement actifs permettait de limiter la prolifération du biofilm dans un réseau de distribution d'eau. En général, les concentrations en COA des EMN sont faibles et ne constituent pas des paramètres contrôlables, les traitements de l'EMN n'étant pas autorisés.

II.3.2.2 *Température*

De nombreux micro-organismes se développent à des températures comprises entre 30 et 40 °C. Par conséquent, il est recommandé d'éviter ces températures dans les réseaux d'eau

chaude et d'isoler thermiquement ces canalisations pour maintenir une température supérieure à 50 °C, lorsque cela est possible. Rogers *et al.* (1994) décrivent par exemple une réduction du nombre de bactéries au sein d'un biofilm hydrique lorsque la température dans le réseau étudié est de 60 °C. Par ailleurs, les auteurs ont noté, à cette température, la disparition de *L. pneumophila* détectée dans le biofilm.

La maîtrise de la température est particulièrement importante pour les exploitants thermaux qui utilisent l'eau à des températures proches de 37 °C pour la réalisation des soins (38 °C pour les soins de rhumatologie à la station thermale de Dax). Il est par exemple préconisé de refroidir l'eau à la température des soins au plus près des points d'usage.

II.3.2.3 Nettoyage des réseaux de canalisations

Le nettoyage des canalisations d'un réseau consiste à éliminer les dépôts macroscopiques (dépôts d'oxydes, de tartre) qui ont souvent tendance à se former dans les réseaux d'eaux fortement minéralisées comme les eaux thermales. Outre l'altération des paramètres organoleptiques de l'eau (coloration par exemple), ces dépôts peuvent induire la dégradation microbiologique de l'eau. Lechevallier *et al.* (1987) ont en effet montré que les tubercules ferreux (dépôts résultant de l'oxydation du fer) peuvent héberger des taux élevés de bactéries coliformes. Les actions de nettoyage ont aussi une action sur le biofilm une fois formé et sur les bactéries adhérees en phase d'adhésion réversible et irréversible (voir paragraphe II.2.4.2.3).

Plusieurs méthodes sont disponibles, mais le choix d'une technique dépend essentiellement de la compatibilité des traitements avec le matériau constitutif du réseau à traiter (Tableau II-13 (CSHPF *et al.*, 1999)).

Tableau II-13. Compatibilité des matériaux constitutifs des réseaux et traitements de nettoyage (CSHPF *et al.*, 1999).

Nature du matériau	Caractéristiques	Air et eau (1 m/s)	Eau seule (2 m/s)	Obus racleurs	Nettoyage chimique
Fonte ancienne	joint plomb 100 mm	-	+	+	+
Fonte ductile	100 mm	+	+	+	+
Acier galvanisé	100 mm	+	+	+	-
	< 100 mm	+	+	-	-
Cuivre	100 mm	+	+	-	-
Acier inoxydable 304 ou 316L	100 mm	+	+	+	+
	< 100 mm	+	+	-	-
Polyéthylène (PE)	100 mm	+	+	-	+
	< 100 mm	+	+	+	+
Polychlorure de vinyle (PVC)	100 mm	+	+	+	+
	< 100 mm	+	+	-	+
Polypropylène (PP)	100 mm	+	+	+	+
	< 100 mm	+	+	-	+

Le nettoyage peut être réalisé par augmentation de la vitesse du fluide dans le réseau et peut être effectué grâce à un mélange « air-eau », injecté à une vitesse de l'ordre de 1 m/s, ou grâce à de l'eau seule, à une vitesse comprise entre 2 et 2,5 m/s. Des obus de raclage, en matériau élastomère (type silicone) peuvent aussi être utilisés (Figure II-17) et permettent l'abrasion des dépôts sur les canalisations. Dans ce cas, le réseau doit être équipé de « gares » d'entrée et de sortie, pour l'insertion et la récupération des obus, et une pression de 2 bars doit pouvoir être appliquée dans le réseau pour pousser l'obus.



Figure II-17. Obus de raclage des canalisations (www.ab6.net).

Des techniques de nettoyage chimiques sont également communément pratiquées. L'eau oxygénée et l'acide carboxylique sont utilisés pour l'élimination d'hydroxydes de fer et de manganèse. Des nettoyages acides (acide sulfamique, chlorhydrique additionnés d'inhibiteurs de corrosion comme l'acide phosphorique) sont utilisés pour l'élimination du carbonate de calcium. Ces traitements doivent bien sûr être réalisés en dehors des périodes d'usage du réseau et suivis de rinçages abondants.

II.3.2.4 Traitements de désinfection

Une bonne conception ainsi que la maintenance du réseau, associé à des traitements de nettoyage réguliers ne permettent toutefois pas de s'affranchir complètement d'une prolifération bactérienne sur les canalisations. C'est pourquoi, des traitements de désinfection ponctuels sont appliqués régulièrement, de manière préventive mais aussi curative. Ils ont pour but de limiter la formation du biofilm, *a fortiori* dans un réseau transportant de l'EMN ne contenant pas de désinfectant résiduel.

II.3.2.4.1 Traitements utilisés en milieu thermal

Lors de ces traitements, la quantité de désinfectant introduite doit être telle que la concentration cible soit atteinte dans tout le réseau, notamment aux points d'usage et au niveau de toutes les purges et robinets, et ce pendant toute la durée du traitement. Ce point implique de vérifier la concentration résiduelle du désinfectant dans le réseau pendant le traitement (mesure du pH ou réactions spécifiques), si possible, et de la réajuster si nécessaire. Suite au traitement, un rinçage efficace doit être effectué pour éliminer toutes traces de désinfectant dans l'EMN en circulation. Cette élimination est également validée par des mesures de la concentration en biocide.

Plusieurs types de traitements ont été proposés par le Conseil Supérieur d'Hygiène pour la désinfection mais dépendent essentiellement de la nature du matériau constitutif du réseau de l'établissement (Tableau II-14 (CSHPPF *et al.*, 1999)).

Tableau II-14. Compatibilité des matériaux constitutifs des réseaux et traitements de désinfection (CSHPF *et al.*, 1999).

	Traitement thermique	Soude	Chlore (2 ppm)	Chlore (10 à 150 ppm)	Chloramines (100 à 150 ppm)	H ₂ O ₂ ± ac. peracétique (1000 ppm)
Fonte ancienne (joint plomb)	-	-	+	+	+	+
Fonte ductile (nouveaux réseaux)	+	+	+	+	+	+
Acier galvanisé	-	-	+	+	+	+
Cuivre	+	+	+	+	+	+
Inox 304 ou 316L	+	+	+	-	+	+
PE	-	+	+	+	+	+
PVC	-	+	+	+	+	+
PP	A vérifier	+	+	+	+	+

Parmi les différentes méthodes, on distingue les désinfections par choc thermique des désinfections chimiques (CSHPF *et al.*, 1999).

Le choc thermique est réalisé par l'introduction dans le réseau d'eau (potable ou EMN) à une température d'environ 80 °C, de manière à ce que la température dans l'ensemble du réseau soit toujours de 70 °C. L'utilisation de vapeur d'eau basse pression (à 115 °C environ, pendant une demi-heure) peut aussi être envisagée, si la nature du réseau le permet. Un des avantages de ce traitement est que le suivi peut être réalisé facilement en équipant le réseau de thermomètres. D'autre part, aucun résidu chimique ne persiste après le choc. Toutefois, le rinçage du réseau est nécessaire pour ramener la température à celle de l'EMN.

Les traitements chimiques sont différenciés en traitements oxydants et non-oxydants (soude).

Les traitements oxydants restent les plus communément utilisés :

- Les **composés chlorés** sont utilisés depuis plusieurs décennies à des fins de désinfection (fin XVIII^{ème}, début XIX^{ème} siècle). Plusieurs dérivés existent : dioxyde de chlore, hypochlorite de calcium, de lithium, de potassium et de sodium (ou eau de

Javel).

- Le **chlore** et ses dérivés ont pour particularité d'être hydrolysés en solution pour donner de l'acide hypochloreux (HClO), du chlore élémentaire (Cl₂) et l'ion hypochlorite (ClO⁻), l'ensemble de ces molécules constituant le chlore actif. Le chlore est un oxydant fort qui peut être utilisé à des fins curatives, à des doses allant de 10 ppm jusqu'à 100 voire 150 ppm. Son action est immédiate sur les micro-organismes libres. Un rinçage est indispensable, notamment à de fortes concentrations (50 à 100 ppm). Il est à noter que le chlore n'est pas compatible avec certains matériaux comme l'acier inoxydable.
- Les **chloramines** sont des oxydants faibles qui ne réagissent que faiblement avec les polysaccharides du biofilm et peuvent donc théoriquement pénétrer à l'intérieur de celui-ci et le détruire. Les concentrations d'usage sont de 100 à 150 ppm pour un temps d'action de 12 heures. L'opération de désinfection doit être suivie d'un rinçage très soigneux et dont l'efficacité aura été vérifiée. Ce procédé n'est, à ce jour, pas en usage en France.
- Le **peroxyde d'hydrogène** peut être utilisée seul ou combiné à l'acide peracétique. Les traitements préconisés sont de 1000 ppm en H₂O₂, avec des temps de contact de 2 à 3 heures en cas de traitements préventifs à espace de temps régulier. Si l'eau oxygénée utilisée seule a l'avantage de ne produire aucun sous-produit de désinfection, le mélange eau oxygénée et acide péracétique conduit à la formation d'acide acétique qui doit être éliminé par rinçage puisqu'il constitue une source de carbone biodégradable.

Pour terminer, le traitement à la soude (pH 12, temps de contact 30 min) est aussi proposé en tant que technique de désinfection non oxydante. Cette méthode est efficace contre tout type de micro-organismes et l'élimination du produit peut facilement être suivie par mesure du pH dans l'EMN en circulation. Toutefois, compte tenu de la difficulté de manipulation, ce produit est peu utilisé.

Devant le manque d'efficacité de certains traitements, voire la réduction de sensibilité de certains micro-organismes dans les réseaux, les établissements thermaux sont en demande de

nouvelles formulations ou protocoles d'utilisation. Ainsi, des formulations comme le peroxyde d'hydrogène associé à des ions argent (Sanosil ®) sont de plus en plus proposées et utilisées en désinfection de réseaux. L'association de ces deux composants permet d'obtenir un effet biocide considéré comme synergique et donc une meilleure élimination des micro-organismes. D'après les données du fournisseur, le Sanosil ® agit sur de nombreux micro-organismes (bactéries à Gram positif et négatif, virus, spores, levures, amibes) et aurait aussi une activité sur le biofilm. Son usage est ainsi répandu dans de nombreuses industries (agroalimentaires, cosmétiques) ou structures (hôpitaux, tours aéroréfrigérantes...) ainsi qu'en établissement thermal. Dans le secteur du traitement de l'eau, il est proposé aussi bien pour la désinfection de l'eau que des surfaces en contact avec l'eau (canalisation, stockage, robinets et fontaines) et connaît un fort succès lié à sa biodégradabilité (www.sanosil.com). Le fournisseur préconise une utilisation de 1,5 à 250 ppm d'H₂O₂ pendant 30 à 240 min.

Récemment, le PolyHexaméthylène Biguanide (PHMB) a été proposé par le fabricant (Mareva) pour la désinfection des réseaux d'eau. Au départ, cette molécule a été développée et commercialisée par deux firmes : l'ICI (Imperial Chemical Company) et sa filiale, Mareva. En 1988, ce produit a été autorisé pour la désinfection des piscines et rapidement Mareva a obtenu le monopole de la fabrication. Le PHMB appartient à la famille des biguanides, comme la chlorexidine (un bis-biguanide). L'enchaînement de plusieurs fonctions biguanides (Figure II-18) au niveau du PHMB aurait pour conséquence une meilleure efficacité par rapport aux bis-biguanides.

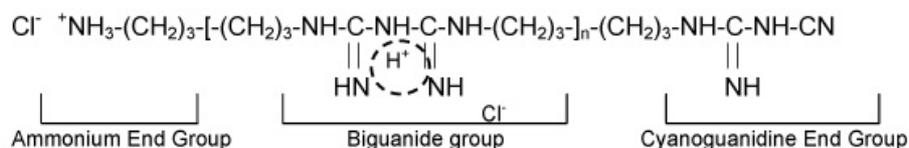


Figure II-18. Formule chimique du PHMB.

Les biguanides sont des molécules qui peuvent avoir deux effets bactéricides sur les micro-organismes en fonction de leurs concentrations :

- De 20 à 50 ppm, les biguanides adhèrent aux membranes ou parois, entraînant des lésions et la fuite des éléments cytoplasmiques (ions, cations bivalents puis molécules organiques dont l'ADN).

- À des concentrations supérieures à 100 ppm, on observe plutôt une coagulation du cytoplasme et la précipitation des protéines et des acides nucléiques (Fleurette *et al.*, 1995).

Des activités bactéricide, sporicide, virucide et fongicide ont été décrites, ainsi qu'une activité sur certains protozoaires (*Naegleria* et *Acanthamoeba*). Il est à noter que le PHMB n'est à ce jour pas agréé pour la désinfection des réseaux d'eau, ni d'EMN.

II.3.2.4.2 Réglementation concernant les traitements de désinfection

Les produits et traitements de désinfection des réseaux utilisés en milieu thermal doivent faire l'objet de validations par le fabricant préalablement à leur commercialisation. Il s'agit de déterminer les couples concentrations d'utilisation/temps de contact efficaces pour l'élimination ou la réduction de micro-organismes pouvant être à l'origine de problèmes sanitaires. Ces produits ou substances actives doivent donc répondre à différentes normes, notamment des normes de phase 1, qui permettent de définir une activité désinfectante de base. En particulier, la norme NF EN 1040 vise à déterminer l'activité bactéricide de base contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* et la norme NF EN 1275 l'activité fongicide contre *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. D'autres normes, dites de phase 2, permettent de déterminer l'efficacité de ces produits dans des conditions proches des conditions d'utilisation (test d'efficacité sur d'autres micro-organismes, en présence de substances interférentes) ou simulant la pratique (sur des portes-germes...). Des normes de phase 3 sont également mentionnées (tests en conditions réelles), mais non standardisées à ce jour.

Dans le cas des désinfectants des réseaux d'eau, la détermination de l'activité bactéricide se base sur la norme NF EN 1040 qui concerne les bactéries *P. aeruginosa* et de *S. aureus*. Après un temps de contact déterminé, le produit biocide est neutralisé et le logarithme du nombre de bactéries éliminées par la désinfection déterminé (réduction logarithmique, RL). Le produit est considéré comme bactéricide, à la concentration, à la température et au temps de contact testés lorsque la RL est supérieure à 5 log, pour les deux micro-organismes tests. Ce test ne constitue qu'une première approche des conditions de traitements et est peu représentatif des conditions réelles de traitement, difficiles à reproduire *in vitro*.

Ainsi, malgré le respect des normes de phase 1 (voir de phase 2) et une utilisation correcte des produits désinfectants, de nombreux articles décrivent des échecs de traitements de désinfection dans des réseaux d'eau. La résistance ou diminution de sensibilité des micro-organismes, par rapport à leur sensibilité théorique, peut s'expliquer par plusieurs phénomènes. Entre autres :

- La présence de zones inaccessibles aux désinfectants (bras morts) où les flux sont faibles. Ces zones ne sont jamais en contact prolongé avec des doses efficaces de désinfectant et représentent donc des niches de développement ou de persistance pour les micro-organismes ;
- La colonisation des réseaux de canalisations par des biofilms qui jouent un rôle protecteur pour les bactéries, notamment vis-à-vis des biocides. Les biofilms sont souvent à l'origine de l'échec des traitements mis en œuvre dans les systèmes de canalisations d'eau, alors que ces mêmes protocoles de désinfection ont été validés *in vitro* par les normes de phase 1 réalisées sur cellules en suspension.

Clairement, la présence de biofilms dans les réseaux de canalisations est un élément-clef pour la compréhension de l'échec des traitements et qui n'est pas pris en compte par les normes actuelles sur l'évaluation des biocides des réseaux d'eau. De nouvelles méthodes mesurant l'activité bactéricide de biocides sur biofilms *in vitro* doivent être mises au point et validées afin de se rapprocher des conditions réelles d'utilisation.

De nombreux outils sont à disposition des gestionnaires de réseaux d'eau pour limiter la prolifération du biofilm : empêcher la colonisation bactérienne par protection de l'émergence, une conception bien pensée du réseau (choix du matériel constitutif, réalisation des plans de canalisations...). Malgré toutes ces précautions, le développement du biofilm à l'intérieur d'un réseau semble inévitable. C'est pourquoi des opérations de nettoyage et de désinfection sont régulièrement réalisées.

Les produits biocides utilisés pour les traitements font actuellement l'objet de validations qui permettent de démontrer une activité bactéricide à une concentration et un temps de contact donné. À l'heure actuelle, les normes d'évaluation des antiseptiques et désinfectants sont essentiellement réalisées sur des bactéries planctoniques. Or, au sein des réseaux d'eau, le problème majeur se situe dans la génération de biofilms sur les canalisations, qui s'accompagne de la diminution de l'efficacité de ces traitements.

L'objet de cette thèse était donc de comparer le pouvoir bactéricide de traitements utilisés pour la désinfection des réseaux d'EMN, à savoir un choc thermique, un choc chloré, un traitement par une combinaison de peroxyde d'hydrogène et d'ions argent (Sanosil ®) et un traitement par le PHMB, sur cellules planctoniques et en biofilms. Dans le but de compléter les normes existantes d'évaluation des biocides, les essais ont été réalisés *in vitro*, sur des biofilms monobactériens, formés par une méthode originale de croissance en milieu appauvri, ce qui permet de s'approcher des conditions de croissance environnementales. Les résultats ont ensuite été complétés par des essais *in situ*, au sein d'un véritable réseau d'eau thermale pilote, afin de valider l'intérêt de la méthode d'évaluation sur biofilms *in vitro*.

Ces travaux ont porté sur l'étude des deux bactéries problématiques au sein d'un réseau d'EMN : *P. aeruginosa* et *L. pneumophila*. Si l'ensemble des essais prévus a été réalisé pour la bactérie *P. aeruginosa*, les essais concernant *L. pneumophila* ont d'abord consisté à mettre en place un modèle de formation de biofilms mono-espèce *in vitro*. En effet, aucun modèle décrit dans la littérature ne satisfaisait nos objectifs de recherche. Cette partie de la thèse a fait l'objet d'une publication dans le journal « Biofouling », parue le 8 septembre 2010.

CHAPITRE III

Matériel et méthodes

III.1 Évaluation in vitro des protocoles de désinfection utilisés en milieu thermal sur *P. aeruginosa*

La première partie de ces travaux de thèse a consisté en l'évaluation de traitements de désinfection de réseaux d'EMN. Cette évaluation s'est faite, dans un premier temps, en termes d'efficacité sur cellules planctoniques *versus* biofilms de *P. aeruginosa*, *in vitro*. Ces essais ont abouti à la détermination de conditions (concentrations et temps de contact) pour la réalisation de traitements *in situ*. Dans un second temps, la poursuite des travaux a donc concerné la validation de certaines conditions de traitement en réseau d'eau minérale naturelle.

Les compositions des milieux utilisés sont présentées en Annexe 4.

III.1.1 Souche utilisée

Les essais ont été effectués avec la souche référencée PAO1 (Collection Institut Pasteur, Paris), dont la séquence génomique a été publiée en 2000, ce qui en fait la souche la plus communément utilisée en recherche. La culture s'est faite sur milieu classique non sélectif (type Trypcase Soja Agar ou TSA, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) à 37±2 °C pendant 48 h. Les souches ont été conservées à -80 °C dans du bouillon Eugon (bioMérieux) additionné de 15% de glycérol (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France).

III.1.2 Désinfectants testés

Les types de traitements testés ont été sélectionnés en fonction de leur fréquence d'utilisation dans les établissements thermaux. C'est pourquoi le chlore et le peroxyde d'hydrogène stabilisé aux ions argent (Sanosil ®) ont été retenus en priorité. En dernier lieu, le Polyhexaméthylène Biguanide (PHMB) a été choisi en vue de son potentiel agrément pour la désinfection des réseaux d'eau et compte tenu des nombreux travaux le concernant (traitements de piscines notamment).

Les solutions de chlore ont été préparées à partir de flacons de concentré d'eau de Javel (9,6 % de chlore actif) disponibles dans le commerce, conservé à l'obscurité et à 4 °C. Une

solution de Sanosil ® Super 25 Ag (Sanosil France, Fromeréville les Vallons, France), contenant 50 % d'H₂O₂ et 0,05 % d'ions argent a été utilisée pour les essais concernant le peroxyde d'hydrogène. Le PHMB, sous forme de solution concentrée, a été fourni par la société Maréva (Saint Martin de Crau, France).

Les solutions-tests ont été préparées extemporanément à partir des solutions concentrées, immédiatement avant les essais. Les dilutions ont été effectuées dans de l'eau physiologique stérile à température ambiante dans des fioles jaugées.

III.1.3 Validation in vitro des protocoles de désinfection utilisés en milieu thermal

III.1.3.1 Évaluation de l'activité bactéricide sur cellules planctoniques

Dans le cas présent, la détermination de l'activité bactéricide des désinfectants sélectionnés vis-à-vis de *P. aeruginosa* a été effectuée selon une méthodologie adaptée de la norme NF EN 1040 (AFNOR, 2006) intitulée « Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de base des antiseptiques et désinfectants chimiques » (Figure III-1). Cette norme correspond à des essais de phase 1.

Pour ces essais, l'ensemble des solutions et suspensions a été préparé dans de l'eau physiologique stérile. Une suspension de *P. aeruginosa* a été préparée par dilution des colonies d'une gélose TSA (2^{ème} repiquage suivant la décongélation de la souche) dans 9 mL d'eau physiologique. La transmission à 640 nm de la suspension a été ajustée à 70 % afin d'obtenir une concentration d'environ 1,5 à 5×10⁸ UFC/mL. Cette suspension initiale a été dénombrée par incorporation d'un millilitre et des dilutions décimales successives dans 15 mL de gélose TSA maintenue en surfusion (45 °C). Les dénombrements d'UFC ont été effectués après 48 h d'incubation à 37±2 °C.

L'essai a été réalisé selon la Figure III-1 : 1 mL de la suspension bactérienne initiale a été transféré dans un tube en verre neutre contenant 9 mL de solution de produit soumis à l'essai.

Après agitation, la concentration finale du produit dans 10 mL correspond à la concentration à tester. Le tube a été incubé à température ambiante pendant le temps de contact déterminé (5 min ou 1 h, soit le temps de contact préconisé). À l'issue du temps de contact et après homogénéisation, 1 mL de la suspension a été prélevé et transféré dans 9 mL de solution neutralisante. Ce nouveau tube a été incubé 5 min à température ambiante. Cette étape permet la neutralisation de l'activité bactéricide du produit testé, permettant ainsi le dénombrement des bactéries cultivables restantes après le traitement de désinfection. Le dénombrement a été effectué par incorporation de 1 mL de suspension (et des dilutions décimales successives) dans 15 mL de TSA. Les boîtes de Petri ont été incubées pendant 48 h à 37 ± 2 °C.

L'efficacité du choc thermique a été mesurée en plaçant une suspension de 10 mL de *P. aeruginosa* ($1,5$ à 5×10^7 UFC/mL) préparée dans de l'eau physiologique stérile dans un bain-marie à 80 °C, pendant 5 min ou 1 h. Le dénombrement des bactéries restantes après choc thermique a été réalisé par incorporation directe de 1 mL de suspension (et des dilutions décimales successives) dans environ 15 mL de TSA en surfusion.

Pour chaque essai effectué, la non-toxicité du neutralisant a été validée par incorporation de 1 mL de suspension bactérienne de *P. aeruginosa* (10^3 UFC/mL en moyenne) à 9 mL de neutralisant. Le dénombrement bactérien de cette suspension a été effectué après 5 min d'incubation à température ambiante, en incorporant 1 mL de suspension à 15 mL de TSA. Le dénombrement de la suspension calibrée à 10^3 UFC/mL a également été réalisé après dilution au $1/10^{\text{ème}}$. Ce témoin est valide lorsque le nombre d'UFC après 5 min de contact avec le neutralisant est supérieur ou égal à 0,5 fois le nombre d'UFC introduites.

De la même manière, pour chaque essai, l'efficacité de l'étape de neutralisation a été validée par ajout de 1 mL de produit à tester à la plus forte concentration à 8 mL de neutralisant. Ce tube a été incubé pendant 5 min à température ambiante puis 1 mL de suspension bactérienne (10^3 UFC/mL en moyenne) a été ajouté. Après 30 min, la suspension ainsi obtenue a été dénombrée. Le témoin d'efficacité de l'étape de neutralisation est valide lorsque le nombre d'UFC dans le mélange après 30 min d'incubation est supérieur ou égal à 0,5 fois le nombre d'UFC introduites.

L'efficacité d'un désinfectant est exprimée en réduction logarithmique (RL) engendrée, pour une concentration et un temps de contact donnés. La RL correspond à la différence entre le nombre de logarithmes décimaux d'UFC initialement présents dans la suspension bactérienne exposée au produit désinfectant et le nombre de log d'UFC restant après le temps de contact déterminé. D'après la norme NF EN 1040, la RL doit être d'au moins 5 logarithmes pour qu'un produit soit considéré efficace (bactéricide) à la concentration et au temps de contact testés.

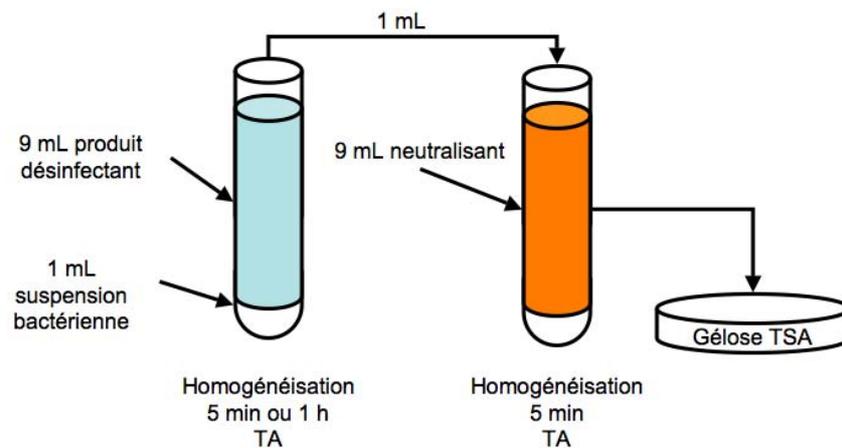


Figure III-1. Schéma du protocole d'évaluation de l'activité bactéricide sur cellules de *P. aeruginosa* en suspension (TA : température ambiante).

III.1.3.2 Évaluation de l'activité bactéricide sur biofilms à *P. aeruginosa*

Le Laboratoire de Microbiologie Industrielle (Faculté de Pharmacie de Toulouse) dispose d'une méthode simple d'obtention de biofilms de *P. aeruginosa* en microplaque. Cette technique permet la production de biofilms mono-espèces structurés en milieu appauvri (concentration faible en nutriments), favorisant la multiplication des bactéries adhérees plutôt que planctoniques (Khalilzadeh *et al.*, 2010). Le support microplaque permet en outre des analyses aisées de la structure du biofilm (prélèvements bactériens, observations microscopiques) et le criblage simultané de plusieurs conditions de traitement.

Une suspension de *P. aeruginosa* a été préparée dans de l'eau physiologique stérile (voir

chapitre I.3.1). À partir de cette suspension, 15 à 50 UFC de *P. aeruginosa* ont été introduites dans les puits d'une microplaque 24 puits en polystyrène non-traitée stérile (BD Falcon, San Jose, CA, États-Unis), contenant 2 mL de milieu Bouillon Biofilm Modifié (MBB, voir composition en annexe). Tous les puits de la microplaque ont été inoculés avec la même suspension bactérienne initiale et traités de la même manière pendant la formation du biofilm. Pour chaque microplaque, un témoin positif a été effectué (puits inoculé non exposé à un traitement) ainsi qu'un témoin négatif (puits non inoculé).

Les microplaques ont été incubées 48 h à 37 ± 2 °C. Le milieu de culture a été renouvelé 2, 4, 6, 20 et 24 h après l'inoculation afin de favoriser la croissance des bactéries adhérees et éliminer les bactéries planctoniques issues du biofilm : les puits ont été vidés délicatement, rincés deux fois avec 2 mL d'eau physiologique stérile, puis ont reçu 2 mL de milieu MBB neuf.

Les chocs biocides ont été appliqués après 48 h d'incubation, sur des biofilms matures (voir Figure III-2). Les puits ont été vidés, rincés 2 fois par 2 mL d'EDS puis ont reçu 2 mL de solution biocide à tester à la concentration définie. La microplaque a ensuite été incubée à température ambiante 1 h. Les puits soumis à un choc thermique ont reçu 2 mL d'eau physiologique ne contenant pas de molécule biocide et ont été placés au bain-marie à 80 °C pendant 1 h. Les prélèvements du biofilm ont été effectués après 2 rinçages (2 mL d'EDS). Les puits ont ensuite reçu 1 mL d'EDS et les bactéries adhérees ont été récupérées par grattage (1 min) à l'aide d'une spatule de pesée stérilisée à la flamme : cette étape permet la remise en suspension des bactéries du biofilm et la séparation des agrégats. La suspension ainsi obtenue a été dispersée par agitation au vortex, diluée et les bactéries dénombrées par inclusion de 1 mL de suspension et des dilutions successives au $1/10^{\text{ème}}$ dans du TSA. Les boîtes ont été incubées 48 h à 37 ± 2 °C.

Un essai est considéré comme valide lorsque aucune bactérie n'est détectée dans le puits témoin négatif et que le nombre de bactéries adhérees dans les puits témoins positifs dépasse $5,5 \log$ d'UFC/puits après 48 h d'incubation. L'efficacité de la désinfection est mesurée par la réduction logarithmique (RL), c'est-à-dire le nombre de \log d'UFC éliminés par la désinfection. La RL pour les cellules en biofilm s'obtient en retranchant le nombre de \log

d'UFC moyen des puits n'ayant pas subi de traitement (témoin positif) au nombre de log d'UFC restant dans les puits ayant subi un traitement.

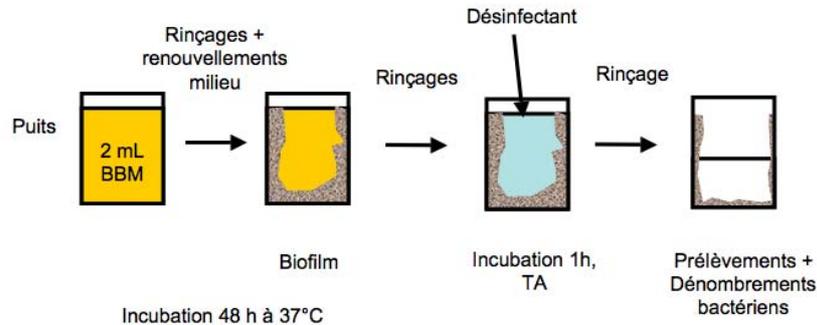


Figure III-2. Schéma du protocole d'évaluation de la sensibilité des biofilms de *P. aeruginosa* aux traitements biocides

Des observations par microscopie classique ont été réalisées dans le but de valider la présence de bactéries adhérees. Il est à noter que cette technique ne permet ni la quantification des bactéries, ni l'analyse de la structure du biofilm (la préparation pour l'observation impliquant le séchage de l'échantillon et donc la dénaturation de sa structure).

Les puits à observer ont été vidés et rincés délicatement 2 fois par 2 mL d'EDS et mis à sécher pendant 1 heure. Deux millilitres de Cristal Violet (CV) ont ensuite été ajoutés. Après 1 minute, les puits ont été vidés, rincés 4 fois par 2 mL d'EDS. Après séchage des puits, les observations ont été réalisées au moyen d'un microscope inversé à contraste de phase (Axiovert 40C, Zeiss, LePecq, France), au grossissement $\times 400$.

III.1.3.3 Analyses statistiques

Les résultats représentent les moyennes d'au moins 2 essais des RL obtenues pour différents traitements. Ces valeurs ont pu être comparées au moyen du test *t* de Student réalisé à l'aide du logiciel MS Excel. Des valeurs *p* inférieures ou égales à 0,01 indiquent des résultats statistiquement différents.

III.2 Essai in situ des protocoles de désinfection utilisés en milieu thermal, en utilisant un réseau-pilote

Suite à la validation *in vitro* de certains protocoles de désinfection pour l'élimination de *P. aeruginosa*, ces techniques ont été reproduites cette fois sur un réseau d'EMN afin de se rapprocher au maximum des conditions réelles de traitements. Deux protocoles de désinfection ont été testés : le choc thermique et la désinfection par le PHMB.

III.2.1 Réseau-pilote

III.2.1.1 Description du réseau et caractéristiques des types d'eau qui l'alimentent

Le réseau-pilote reproduit un réseau d'établissement thermal. Un schéma synoptique de fonctionnement du réseau est fourni sur la Figure III-3. Ce réseau a été construit par une entreprise de plomberie indépendante au niveau du plateau technique de l'Institut du Thermalisme (Dax, France).

La boucle de circulation présente 2 modes d'alimentation (non simultanés) : (i) par l'eau du réseau d'adduction potable (EAP) de la ville de Dax ou (ii) par l'EMN de Dax. Les caractéristiques de ces eaux sont résumées dans le Tableau III-1.

Tableau III-1. Propriétés physico-chimiques des eaux utilisées dans le réseau-pilote. Les concentrations ioniques ont été déterminées par chromatographie ionique.

IS = concentrations inférieures au seuil de détection de la méthode.

Paramètres	Eau adduction potable	EMN de Dax	Unités
Température	22,0	60,1	°C
Conductivité	306,0	1446,0	μS.cm ²
pH	7,76	7,36	Unité pH
Sodium	11,50	127,94	mg/L
Potassium	1,40	20,76	mg/L
Ammonium	IS	0,20	mg/L
Calcium	36,37	126,98	mg/L
Magnésium	2,21	35,03	mg/L
Sulfates	IS	432,13	mg/L
Chlorures	11,27	153,87	mg/L
Nitrites	0,09	IS	mg/L
Phosphates	IS	IS	mg/L
Nitrates	0,36	IS	mg/L

Le réseau est constitué d'acier inoxydable 316L (acier au chrome 17,0 %, nickel 10,3 % et molybdène 2,1 %). Il s'agit d'un matériau couramment utilisé pour la réalisation de réseaux d'EMN qui résiste bien aux températures élevées et à la plupart des traitements chimiques (Tableau II-14).

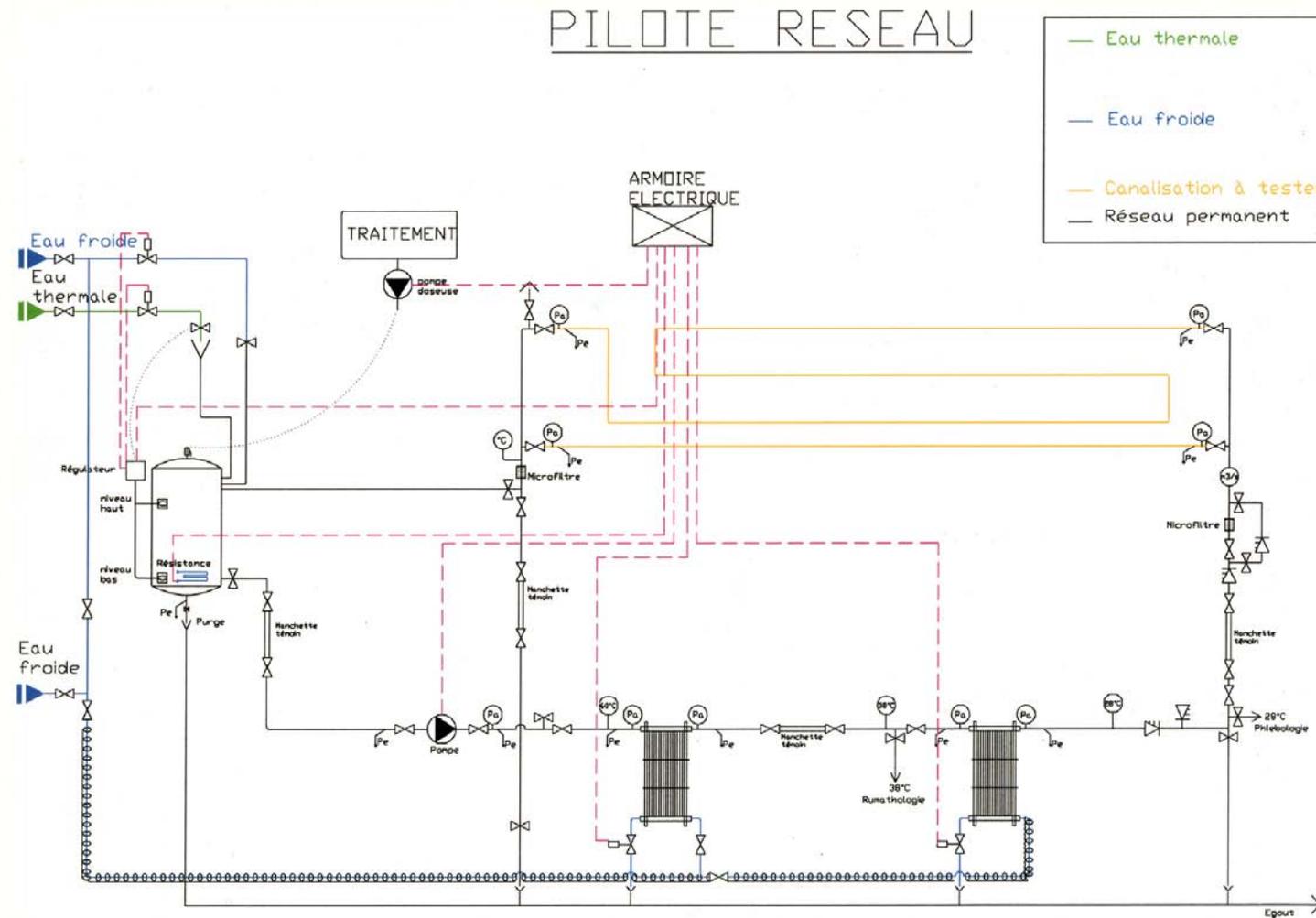


Figure III-3. Schéma synoptique du réseau-pilote

Le réseau est équipé d'un ballon d'eau d'une capacité de 500 L, placé en début de circuit. Il comporte une résistance chauffante permettant la réalisation de désinfections thermiques. Ce ballon assure aussi la disconnexion entre le réseau-pilote et le réseau d'EMN de la ville de Dax. La mise sous pression de l'eau est assurée par une pompe à débit variable située en aval du ballon d'eau. Le débit utilisé pour les essais était de 3600 ± 100 L/h. L'eau passe ensuite à travers 2 échangeurs à plaques. Ces systèmes sont utilisés en milieu thermal pour abaisser la température de l'EMN. Les établissements de la station thermale de Dax, spécialisée dans les soins de rhumatologie et de phlébologie, utilisent des températures d'eau de 38 °C (rhumatologie) et 28 °C (phlébologie). Au niveau du réseau, le premier échangeur abaisse la température de l'eau de 60,1 °C à 38 °C et le 2^{ème} échangeur de 38 à 28 °C. Chaque élément du circuit peut être isolé au moyen de vannes sphériques disposées en amont et aval des différents constituants. Tout au long du circuit sont disposés des systèmes de surveillance des paramètres physiques, lorsque le réseau est en eau : 9 manomètres permettent de vérifier la pression à l'intérieur des canalisations, 5 thermomètres mesurent la température de l'eau et 4 manchettes témoins font office de débitmètres. Le circuit est également équipé de 11 points de prélèvement utilisés pour prélever l'eau en circulation tout au long du réseau. Les robinets équipant ces points de prélèvement sont en INOX 316L et peuvent être flambés afin d'effectuer des prélèvements d'eau en conditions stériles. Ils sont situés en amont et en aval des principaux éléments du système.

Le réseau peut fonctionner en mode ouvert ou fermé : dans le premier cas, l'eau en fin de circuit est rejetée à l'égout. Ce mode correspond à une utilisation normale. En mode fermé, l'eau en fin de circuit est redirigée vers le ballon. Ce mode est utilisé lors de traitements de désinfection (chimique ou thermique).

III.2.1.2 Contamination artificielle du réseau-pilote

La souche utilisée pour ces essais est une souche environnementale de *P. aeruginosa* isolée initialement à partir d'une eau de surface. Le milieu R2A a été choisi pour réaliser les suspensions d'inoculation (Reasoner *et al.*, 1985). Ce milieu, moins riche en nutriments que le milieu TSA, permet à la souche bactérienne de s'adapter à un milieu appauvri avant son transfert dans un milieu oligotrophe, tel que l'EMN.

Avant les essais, la courbe de croissance de cette souche *P. aeruginosa* dans le milieu R2A (Reasoner *et al.*, 1985) a été réalisée afin de valider l'utilisation de ce milieu. Une colonie isolée sur TSA a été inoculée à 200 mL de milieu R2A, incubé à 37 ± 2 °C pendant 8 h sous agitation (400 rpm). Des prélèvements réguliers ont été effectués afin de suivre la DO_{630} de la suspension au cours du temps. D'autre part les échantillons de suspension ont été dénombrés par inclusion de 1 mL de suspension (et des dilutions décimales successives) en TSA. Les résultats montrent que la souche utilisée entre en phase exponentielle de croissance 210 minutes après inoculation et donc que le milieu R2A est adapté à la préparation des suspensions d'inoculation de *P. aeruginosa*.

La suspension d'inoculation a donc été préparée à partir d'un repiquage de 24 h sur TSA incubé à 37 ± 2 °C, dans un Erlenmeyer contenant 200 mL de milieu R2A liquide stérile comme décrit précédemment. Une suspension de $DO_{630} > 0,4$ a été centrifugée à 3400 rpm pendant 15 min. Le culot bactérien a été repris dans 200 mL d'EDS. Cette opération a été renouvelée 3 fois afin d'éliminer le milieu de culture. Les suspensions ainsi obtenues contiennent $8,05 \times 10^8$ UFC/mL en moyenne ($n = 2$). La suspension bactérienne a été versée au niveau du ballon du réseau-pilote préalablement rempli de 400 L d'EMN. L'eau contaminée a ensuite été mise en circulation dans le réseau pendant 1 h 20. Le système est ensuite resté en mode statique pendant 12 h et l'eau contaminée a été vidangée. Le réseau a été remis en eau (EMN) et le réseau a fonctionné quotidiennement (circulation d'EMN 1 h par jour) jusqu'aux essais de désinfection, c'est-à-dire pendant 48 h.

Durant les essais, l'eau contaminée a été recueillie quotidiennement dans un bassin de stockage contenant une solution de chlore concentrée de manière à obtenir une concentration de 3,8 ppm en chlore libre. Cette eau est restée dans le bassin de stockage au moins 12 h avant d'être rejetée.

III.2.2 Prélèvements et analyses

Des séries de 11 prélèvements (correspondant aux 11 points de prélèvement du réseau) ont été effectuées avant et après les traitements de désinfection testés, afin d'évaluer leur efficacité. Les méthodes standard recommandées par l'AFNOR ont été suivies pour les prélèvements et les analyses microbiologiques.

III.2.2.1 Prélèvements

Les robinets de prélèvements ont été flambés au chalumeau pendant 15 secondes. Après refroidissement du robinet, le premier jet a été éliminé puis l'EMN a été collectée dans des flacons de polyéthylène haute densité (ADL & Prochilab, Lormont, France) de 1 L ou 250 mL, stérilisés par ionisation et ne contenant aucun neutralisant (les prélèvements étant constitués d'EMN ne contenant pas de désinfectant). Les analyses ont été réalisées immédiatement après prélèvements ou dans les 24 h suivantes avec conservation des échantillons à 4 °C.

III.2.2.2 Analyses physico-chimiques de l'eau

La température de l'eau circulant dans le réseau a été contrôlée grâce aux 4 thermomètres intégrés sur les canalisations. La température a été relevée quotidiennement en 4 points du réseau, lorsque le réseau fonctionnait en système ouvert.

Le pH et la conductivité ont été relevés pour chaque série d'analyses de 11 prélèvements. Le pH de l'eau a été mesuré sur des échantillons récoltés dans des flacons de polyéthylène haute densité (ADL Prochilab), non acidifiés, à l'aide d'un pH-mètre (Hach, Loveland, CO, États-Unis) étalonné avant chaque mesure. Les mesures ont été effectuées immédiatement après les prélèvements.

La conductivité a été mesurée sur des échantillons d'eau non acidifiés, prélevés dans des flacons de polyéthylène haute densité (ADL Prochilab) au moyen d'un conductimètre (Hach). Le conductimètre était étalonné par des solutions de KCl de concentrations et conductivités connues. Les mesures ont été effectuées immédiatement après prélèvements.

Les concentrations ioniques des eaux circulant dans le réseau (eau d'adduction de la ville de Dax et eau minérale naturelle) ont été déterminées par chromatographie ionique à l'aide d'un appareil ICS-1100 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) sur colonnes échangeuses d'anions (IonPac AS18 Hydroxide-Selective Anion-Exchange Column, Dionex) ou de cations (IonPac CS16 Cation-Exchange Column, Dionex). Les échantillons d'eau (non acidifiés) ont été prélevés dans des flacons de polyéthylène haute densité et analysés immédiatement après les prélèvements. Une analyse des cations et une analyse des anions ont précédé chaque essai. Les résultats ont été comparés aux analyses effectuées par la Régie des Eaux de Dax, en charge des analyses trimestrielles des EMN et EAP de la ville de Dax.

III.2.2.3 Analyses microbiologiques de l'eau minérale naturelle

Analyse de la variation de flore hétérotrophe revivifiable à 22 (FT 22) et 37 °C (FT 37)
(AFNOR, 1999)

2 mL d'eau à analyser (ou d'une dilution décimale de l'échantillon) ont été déposés dans 2 boîtes de Petri dans lesquelles ont été incorporés environ 15 mL de PCA (Plate Count Agar, Oxoid, Dardilly, France) maintenu en surfusion. Une fois le milieu solidifié, une des boîtes a été placée à 37±2 °C (pendant 48 h) pour le dénombrement de la FT 37, et l'autre à 22±2 °C (pendant 72 h) pour le dénombrement de la FT 22. Le résultat est donné en UFC/mL.

Recherche et dénombrement de coliformes totaux et thermotolérants (AFNOR, 2000)

250 mL d'EMN à tester ont été filtrés sur une membrane stérile en ester de cellulose de porosité nominale 0,45 µm (Pall, East Hills, NY, États-Unis). La membrane a ensuite été transférée sur un milieu gélosé TTC (2,3,5-triphényltérazoliumchloride)-tergitol (Oxoid). Le temps d'incubation était de 48 h, à 37±2 °C pour la recherche de coliformes totaux et à 44±2 °C pour la recherche de coliformes thermotolérants. Les colonies jaunes entourées d'un halo jaune constituées de bacilles à Gram négatif (coliformes présumés) ont été repiquées sur gélose TSA (Tryptone Soja Agar, Oxoid) pour la recherche d'oxydase et en bouillon tryptophane pour vérifier la production d'indole. Le résultat est donné en UFC/250mL.

Recherche et dénombrement d'entérocoques intestinaux (AFNOR, 2000)

250 mL d'eau à tester ont été filtrés sur membrane en ester de cellulose de porosité nominale 0,45 µm (Pall). La membrane a ensuite été transférée sur gélose Slanetz et Bartley (Oxoid). Le temps d'incubation était de 48 h à 37±2 °C. Lorsque des colonies roses ou brunes, constituées de coques à Gram positif, étaient présentes, la membrane de filtration a été transférée sur gélose BEA (Bile Esculine Agar, Oxoid) et incubée à 44±2 °C pendant 2 h. Les colonies d'entérocoques ont été confirmées par la présence d'un halo noir. Le résultat est déterminé en UFC/250mL.

Recherche et dénombrement de spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices (AFNOR, 1993)

100 mL d'eau à tester ont été chauffés au bain-marie à 75 ± 1 °C pendant 15 min. L'échantillon refroidi a été filtré sur membrane stérile (porosité nominale 0,2 µm, Pall). La membrane a été placée sur gélose TSC base (Tryptone-Sulfite-Cyclosérine, Oxoïd), le côté comportant les bactéries au contact de la gélose. La boîte a été incubée en anaérobiose à 37 ± 2 °C pendant 48 h. Les colonies noires, correspondant aux bactéries anaérobies sulfito-réductrices, ont alors été dénombrées. Le résultat est donné en UFC/100mL.

Recherche et dénombrement de *P. aeruginosa* (AFNOR, 2002)

250 mL d'échantillon ont été filtrés sur une membrane stérile en ester de cellulose de porosité nominale 0,45 µm (Pall). La membrane a ensuite été transférée sur le milieu CN (Cétrimide Acide Nalidixique, Oxoïd). Après 48 h d'incubation à 37 ± 2 °C, des colonies bleues à vertes et fluorescentes sous lampe UV (360 nm) sont considérées comme étant *P. aeruginosa*. Des colonies fluorescentes ne présentant pas de coloration bleu-vert, constituées de bacilles à Gram négatif peuvent aussi apparaître. Dans ce cas, elles ont été repiquées dans un bouillon acétamide pour vérifier leur capacité à produire de l'ammoniac à partir d'acétamide et confirmer ainsi leur appartenance à l'espèce *P. aeruginosa*. Le résultat est rendu en UFC/250 mL.

Recherche et dénombrement de *L. pneumophila* (AFNOR, 2003)

200 µL d'échantillon à analyser ont été étalés directement sur gélose GVPC (Glycine-Vancomycine-Polymyxine-Cycloheximide, Oxoïd). Parallèlement, 1 L d'échantillon a été filtré sur une membrane de polycarbonate de porosité nominale 0,4 µm (Pall). La membrane a été placée dans un flacon contenant 5 mL d'eau échantillonnée. Les légionelles ont été détachées de la membrane par un traitement aux ultrasons de 3 min, afin d'obtenir un concentrat.

100 µL de concentrat (ou d'une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ du concentrat) ont été étalés directement sur GVPC. Parallèlement, 2 mL ont été chauffés à 50 °C pendant 30 min (échantillon traité thermiquement) et 2 mL ont été mélangés à 2 mL de tampon acide (pH=2, 5 min à température ambiante ; échantillon traité chimiquement). 100 µL des échantillons traités

thermiquement et 200 µL des échantillons traités chimiquement ont été étalés sur deux géloses GVPC. L'ensemble des boîtes a été incubé en enceinte fermée (pour éviter l'évaporation des milieux gélosés) à 37±2 °C pendant 10 jours.

Les colonies de légionelles présumées (gris bleu, avec un aspect de verre fritté et constituées de bacilles à Gram négatif) ont été repiquées successivement sur gélose BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) sans cystéine (Oxoïd), Columbia au sang de mouton (Oxoïd) et BCYE avec cystéine (Oxoïd). Les colonies constituées de bacilles ne se développant que sur BCYE + cystéine appartiennent au genre *Legionella*. Un test au latex (Legionella Latex Test, Oxoïd) a permis de vérifier s'il s'agissait de l'espèce *L. pneumophila* et, le cas échéant, de définir le séro groupe des colonies. Les résultats sont exprimés en UFC/L.

III.2.3 *Protocoles de désinfection*

III.2.3.1 *Choc thermique*

Pour la réalisation de chocs thermiques, le réseau contaminé par *P. aeruginosa* a été vidangé et rempli d'EAP. La résistance chauffante a été mise en marche pour élever la température de l'eau à 80 °C (vérifiée sur le thermomètre du ballon d'eau). Une fois cette température atteinte, l'eau chauffée a été mise en circulation dans tout le réseau (système fermé, sans fonctionnement des échangeurs) pendant 1,5 h. La température dans l'ensemble du circuit a été vérifiée grâce aux thermomètres branchés sur les canalisations.

III.2.3.2 *Choc chimique par le PHMB*

Le choc chimique a été réalisé en ajoutant la solution de PHMB fournie dans 400 L d'EAP (24±2 °C) au niveau du ballon d'eau, afin d'atteindre une concentration de 25 ppm. La solution a été mise en circulation dans le réseau pendant 15 minutes pour favoriser la dilution de la solution de PHMB. Un traitement de 1 heure a ensuite été appliqué par circulation de la solution désinfectante (circuit fermé, à 24±2 °C). Après le traitement, le réseau a été vidangé puis rincé par de l'EMN mise en circulation pendant 30 min (circuit ouvert).

III.2.4 *Analyses statistiques*

Les résultats représentent les concentrations bactériennes moyennes aux 11 points du réseau. Les valeurs obtenues à différents temps de prélèvement ont été comparées au moyen du test *t* de Student réalisé à l'aide du logiciel MS Excel. Des valeurs *p* inférieures ou égales à 0,01 indiquent des résultats statistiquement différents.

III.3 *Évaluation de traitements de désinfection sur L. pneumophila*

Le deuxième objectif de cette thèse concernait initialement l'évaluation de traitements de désinfection sur *L. pneumophila* (notamment sous forme de biofilms) afin de déduire les conditions optimales de traitements pour la désinfection de réseaux d'EMN. Rapidement, cet objectif a dû être réévalué, les modèles de formation de biofilms *in vitro* à *L. pneumophila* décrits dans la littérature n'étant pas satisfaisants. Par conséquent, la première étape de ce travail a consisté à mettre au point un modèle de formation de biofilm à *L. pneumophila in vitro*, adapté à la réalisation de notre objectif premier.

Dans un second temps, ce modèle a été éprouvé par des essais concernant l'efficacité *in vitro* d'un choc thermique suivis d'essais *in situ*, similaires à ceux menés avec *P. aeruginosa*.

III.3.1 *Souches bactériennes*

Pour ces essais, quatre souches ont été utilisées. La souche *L. pneumophila* Philadelphia 1, CIP 103 854, a été utilisée en tant que souche de référence (Collection Institut Pasteur). Son génome a été complètement séquencé en 2004 (Chien *et al.*).

Deux souches environnementales, de séro groupe 2 – 14 ont été utilisées ; l'une a été isolée à partir d'un réseau d'eau chaude sanitaire (HW S2-14), l'autre à partir d'un réseau d'eau minérale naturelle (NMW S2-14). La quatrième souche est un isolat environnemental issu d'un réseau d'eau chaude sanitaire et de séro groupe 1 (HW S1).

Les souches sont conservées dans du bouillon Eugon additionné de 15% de glycérol, à -80 °C. Avant chaque essai, la bactérie est mise en culture sur Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), incubée à 37±2 °C pendant 72 h. Ce milieu nutritif est supplémenté en pyrophosphate ferrique (0,25 g/L) et chlorhydrate de cystéine (0,4 g/L) (supplément de croissance *Legionella* bioMérieux) pour permettre la croissance des

espèces du genre *Legionella*.

Avant chaque essai, la pureté des colonies a été vérifiée par coloration de Gram. Les suspensions de *L. pneumophila* ont été réalisées à partir de colonies issues d'un repiquage sur gélose BCYE, dans 10 mL de milieu de culture pour la formation de biofilm (Tableau III-2). La transmission des suspensions a été ajustée à 60 % ($DO_{600}=0,220$) afin d'obtenir une concentration bactérienne d'environ 10^8 UFC/mL.

III.3.2 Mise au point du modèle d'obtention de biofilms à *L. pneumophila* en microplaque

Le Laboratoire de Microbiologie Industrielle disposait, préalablement à ces essais, d'un protocole permettant la formation de biofilms à *P. aeruginosa* (voir III.1.3.2). Ce protocole permet le criblage de plusieurs molécules biocides afin de déterminer la sensibilité des biofilms bactériens. L'objet de ces recherches était la modification de ce protocole pour permettre l'obtention de biofilms mono-espèce de *L. pneumophila*.

Les supports choisis pour la production de biofilms sont des microplaques 24 puits stériles (BD-Falcon), dans le but de faciliter la sélection de différentes conditions de formation du biofilm et, ultérieurement, le criblage de différentes molécules biocides.

Les puits d'une microplaque ont initialement reçu 2 mL d'une suspension calibrée de *L. pneumophila* (10^6 ou 10^2 UFC/mL) préparée dans le milieu de culture à tester. Les microplaques ont ensuite été incubées pendant 6 à 20 jours. Différentes températures ont été testées pour la formation du biofilm : $37,0 \pm 2$ °C qui correspond à l'optimum de croissance de *L. pneumophila*, 22,5 °C et 43,0 °C. Pendant le temps d'incubation, le milieu a été renouvelé tous les 3 jours, après 2 rinçages délicats avec 2 mL d'EDS, afin d'éliminer les bactéries planctoniques et favoriser la croissance du biofilm.

III.3.2.1 Sélection d'un milieu de culture adapté à la production de biofilm de *L. pneumophila*

Plusieurs types de milieux ont été testés afin de favoriser la croissance adhérente de *L. pneumophila*.

- **milieux oligotrophes** : eau distillée stérile (EDS), eau d'adduction potable (EAP, ville de Toulouse ; $\text{Na}^+ = 13,0 \text{ mg/L}$, $\text{K}^+ = 1,1 \text{ mg/L}$, $\text{Ca}^{2+} = 34,0 \text{ mg/L}$, $\text{SO}_4^{2-} = 23,0 \text{ mg/L}$, $\text{Cl}^- = 12,0 \text{ mg/L}$, pH 7,9) stérilisée par filtration (0,22 μm , ERS) ou non stérile (ERNS), eau minérale naturelle de Dax stérilisée par filtration (0,22 μm , EMN ; $\text{Na}^+ = 128,9 \text{ mg/L}$, $\text{K}^+ = 20,8 \text{ mg/L}$, $\text{NH}_4^+ = 0,2 \text{ mg/L}$, $\text{Ca}^{2+} = 127,0 \text{ mg/L}$, $\text{Mg}^{2+} = 35,0 \text{ mg/L}$, $\text{SO}_4^{2-} = 432,1 \text{ mg/L}$, $\text{Cl}^- = 153,9 \text{ mg/L}$, $\text{Fe}^{2+} = 0,08 \text{ mg/L}$, pH 7,4).
- **milieux oligotrophes supplémentés en fer et cystéine** (supplément *Legionella* bioMérieux) : sERS, sEMN ;
- **bouillons semi-synthétiques à faibles concentrations en nutriments** : bouillon biofilm basique, BB (Alasri *et al.*, 1992) et bouillon biofilm modifié, MBB (Khalilzadeh *et al.*, 2010) ;
- **bouillons semi-synthétiques à faibles concentrations en nutriments, supplémentés en fer et cystéine** (supplément *Legionella* bioMérieux, dilué au $1/10^{\text{ème}}$) : bouillon biofilm supplémenté (SBB) et bouillon biofilm modifié supplémenté (SMBB).

La composition de ces milieux est récapitulée dans le Tableau III-2.

Tableau III-2. Composition des milieux de culture utilisés pour la mise au point d'un protocole de formation de biofilms à *L. pneumophila*

Composition	Concentration (mg/L)	Bouillon Biofilm (BB)	Bouillon Biofilm Supplémenté (SBB)	Bouillon Biofilm Modifié (MBB)	Bouillon Biofilm Modifié Supplémenté (SMBB)
MgSO ₄ (Sigma)	200.0	+	+	+	+
FeSO ₄ (Prolabo)	0.5	+	+	+	+
Na ₂ HPO ₄ (Sigma)	1250.0	+	+	+	+
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	500.0	+	+	+	+
Acides casaminés (Difco)	100.0	+	+	-	-
Lactose (Difco)	25.0	+	+	-	-
Extrait de levure (AES)	100.0	+	+	-	-

Composition	Concentration (mg/L)	Bouillon Biofilm (BB)	Bouillon Biofilm Supplémenté (SBB)	Bouillon Biofilm Modifié (MBB)	Bouillon Biofilm Modifié Supplémenté (SMBB)
Glucose (Sigma)	50.0	-	-	+	+
Supplément (BioMérieux)	Dilué au 1/10 ^{ème}	-	+	-	+

Les deux « Bouillons Biofilm » (BB et MBB) ont déjà été validés pour la formation de biofilms à *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus* (Alasri *et al.*, 1992; Pineau *et al.*, 1997; Samrakandi *et al.*, 1997; Campanac *et al.*, 2002; Khalilzadeh *et al.*, 2010). La composition minérale de ces milieux est similaire, mais ils diffèrent par leur source de carbone : le MBB contient seulement du glucose, alors que le BB contient du lactose et des aminoacides (extrait de levure et acides aminés). Le Bouillon Biofilm Supplémenté (SBB) et le Bouillon Biofilm Modifié Supplémenté (BBMS) sont des dérivés des milieux BB et MBB supplémentés en fer et cystéine (supplément *Legionella*, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France, dilué au 1/10^{ème}).

En dernier lieu, le milieu liquide BYE (*N*-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES)-Buffered Yeast Extract) a été utilisé. Ce milieu riche, classiquement utilisé pour la croissance planctonique de *L. pneumophila* (Ristroph *et al.*, 1980), a également été validé pour la production de biofilms mono-espèces de *L. pneumophila* (Mampel *et al.*, 2006; Piao *et al.*, 2006; Hindre *et al.*, 2008). Mampel *et al.* ont toutefois démontré que dans ce milieu la croissance se faisait essentiellement de manière planctonique et non sous forme sessile.

III.3.2.2 Dénombrements des cellules adhérees

Les prélèvements ont été réalisés dès 2 h après inoculation de *L. pneumophila* afin d'évaluer l'adhésion microbienne initiale, puis à différents temps d'incubation pour déterminer la cinétique du développement bactérien sous forme sessile. Après 2 rinçages successifs avec 2 mL d'EDS, 1 mL d'EDS a été ajouté et les puits ont été grattés avec une spatule de pesée à bout carré stérile pendant 1 min dans le but de détacher les cellules du biofilm et désagréger les microcolonies. Après agitation au vortex, le dénombrement cellulaire des échantillons a été effectué soit par culture sur BCYE soit par PCR quantitative (qPCR).

Des quantifications de cellules en suspension dans les puits contenant des biofilms ont également pu être effectués. Dans ce cas, 100 µL d'échantillon ont été directement prélevés au centre du puits de culture.

III.3.2.2.1 *Dénombrements des cellules viables et cultivables*

Les cellules viables et cultivables ont été numérées par étalement de 100 µL d'échantillon (et des dilutions décimales successives) sur BCYE. Après 5 j d'incubation à 37 °C, les colonies caractéristiques du genre *Legionella* ont été dénombrées puis repiquées sur gélose UNBCYE (BCYE non supplémenté en fer ou en cystéine, bioMérieux) et gélose Columbia au sang (bioMérieux). Une absence de croissance sur UNBCYE et Columbia permet de confirmer l'appartenance des colonies au genre *Legionella*. Le test d'agglutination latex (Oxoïd, Basingstoke, Royaume-Uni) a permis de confirmer l'identification au rang d'espèce et le séro groupe des colonies. Cette méthode permet également de vérifier qu'aucune contamination n'a eu lieu pendant les essais.

III.3.2.2.2 *Analyses par PCR en temps réel*

Les analyses par qPCR ont permis de quantifier le nombre de copies de génomes (correspondant au nombre de cellules viables, non-viables et l'ADN extracellulaire - eDNA) contenues dans un échantillon (biofilm ou cellules planctoniques). L'extraction, la purification et l'amplification de l'ADN des échantillons se font selon le protocole établi par la société GeneSystems, à l'aide des réactifs fournis (Yaradou *et al.*, 2007). Ce protocole suit les recommandations de la norme expérimentale XP T90-471 (AFNOR, 2006) pour la quantification de légionelles dans l'eau. Les échantillons ont été filtrés sur membranes de polycarbonate stériles (0,45 µm). Les analyses ont été réalisées à partir des membranes conservées à -20 °C pendant moins d'une semaine avant les essais.

La lyse bactérienne a été obtenue par sonication de la membrane de filtration (20 min, puissance 250 W et fréquence 40 Hz) puis chauffage (10 min, 100 °C) dans 1,5 mL de tampon de lyse. Après élimination des débris cellulaires par filtration sur colonne, l'ADN du lysat est fixé sur une colonne de silice et rincé par 2 tampons à base d'éthanol (Genesystems). L'ADN est élué dans 300 µL de tampon d'éluion (Genesystems). L'analyse par qPCR se fait immédiatement ou à partir d'échantillons d'ADN conservés à -20 °C. Les échantillons

d'ADN n'ont pas été décongelés plus d'une fois avant l'analyse par qPCR, afin de ne pas dégrader l'ADN.

La qPCR a été réalisée dans les puits d'un GeneDisc (Figure III-4) contenant les amorces et la sonde lyophilisée, où sont ajoutés 36 μL d'échantillon d'ADN mélangés à 36 μL de mix réactionnel (tampon PCR, Taq polymérase, dNTP et MgSO_4 , GeneSystems). Chaque analyse d'échantillon a été triplé. Des témoins d'inhibition de PCR ont été réalisés pour chaque échantillon, dans 2 puits réactionnels contenant de l'ADN exogène de *L. pneumophila* ainsi qu'un témoin négatif de PCR (puits sans amorces).



Figure III-4. GeneDisc et puits réactionnels. Un secteur de 6 puits représente les analyses réalisées pour un échantillon (2 témoins positifs, 1 témoin négatif, 3 quantifications d'échantillon).

Chaque cycle de PCR comprend une étape de dénaturation à 105 °C, une étape de transition froide à 48 °C, une étape d'hybridation et élongation à 60 °C. Le premier cycle est précédé d'une étape « hot start » à 115 °C. Chaque cycle dure 45 s. La fluorescence libérée dans les puits est mesurée à la fin de chaque cycle de PCR. 45 cycles sont suffisants pour visualiser le Ct (Cycle threshold) et quantifier l'ADN de *L. pneumophila* dans les échantillons (Figure III-5).

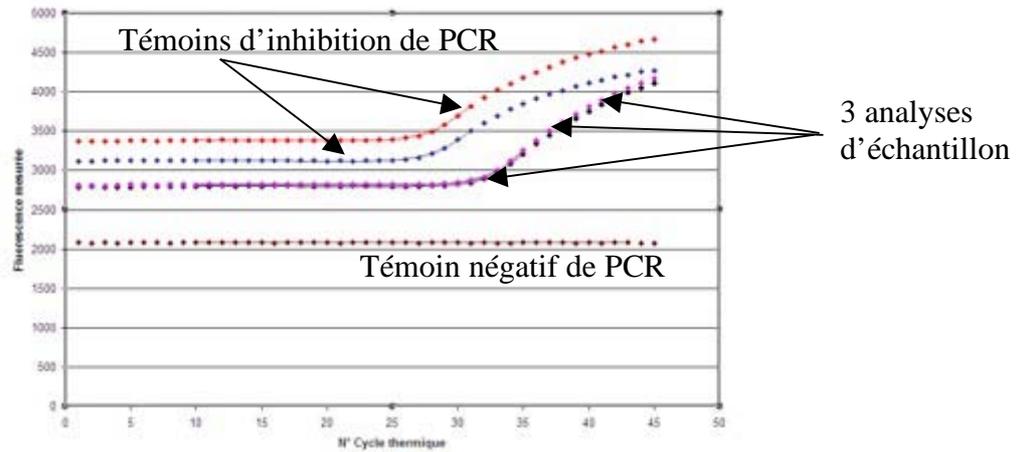


Figure III-5. Courbes de fluorescence en fonction du nombre de cycles dans les 6 puits dédiés à l'analyse d'un échantillon.

Si les témoins sont valides, le Ct moyen de l'échantillon (moyenne des Ct des 3 analyses de l'échantillon) est calculé par le logiciel d'analyse du GeneCycler.

La gamme étalon est établie grâce à de l'ADN calibré de *L. pneumophila* (ATCC 33152, Genesystems) sur un seul Genedisk et permet de corréler les Ct mesurés à une quantité d'ADN. Les Ct de 5 échantillons d'ADN de *L. pneumophila* de quantité connue (25 , $2,5 \times 10^2$, $2,5 \times 10^3$, $2,5 \times 10^4$, $2,5 \times 10^5$ UG) sont déterminés. La courbe de calibration est établie par le logiciel Genesystems. Le logiciel utilisé pour l'analyse des résultats de qPCR fournit les résultats dans le volume initialement filtré.

III.3.2.3 Caractérisation de la croissance de *L. pneumophila* en milieu liquide

Pour vérifier la capacité de *L. pneumophila* à croître de manière planctonique en milieu liquide, des suspensions de *L. pneumophila* (souches CIP 103854 et HW S 2-14) ont été préparées dans les milieux BYE et SBB. Les concentrations bactériennes ont été ajustées à une $DO_{600} = 0,220$ nm (soit environ 10^8 UFC/mL). 10 mL de suspensions ont été placés dans des tubes en verre neutre, afin de limiter l'adhésion bactérienne, et mis sous agitation (200 rpm) à 37 ± 2 °C pendant 3 j, période correspondant à l'intervalle de temps entre deux renouvellements de milieu en microplaques 24 puits. La croissance planctonique a été suivie

par des mesures quotidiennes de la DO₆₀₀.

III.3.2.4 *Analyse de biofilms par observation en microscopie confocale*

La microscopie confocale couplée à l'utilisation de marqueurs fluorescents a été choisie pour l'analyse de la structure tridimensionnelle des biofilms. Afin de pouvoir utiliser les objectifs à immersion du microscope, les biofilms ont été préparés en microplaques 6 puits (BD Falcon).

III.3.2.4.1 *Marquages cellulaires*

La biomasse totale du biofilm a été visualisée par marquage au Syto[®] 9 (Molecular Probe, Invitrogen, Eugene, OR). Il s'agit d'un marqueur d'acides nucléiques, diffusant librement à travers les membranes et parois cellulaires et qui permet donc la visualisation des acides nucléiques intra- et extracellulaires et des cellules endommagées. Ce marqueur présente un shift de fluorescence important dans le vert lorsqu'il est lié aux acides nucléiques. Il ne peut donc être visualisé que lorsqu'il est fixé à l'ADN ou l'ARN. Pour les observations, 0,5 µL de Syto[®] 9 (Invitrogen, 5 mM) a été introduit directement dans le puits à observer en présence du milieu de culture. Aucun rinçage n'a été effectué avant les observations, les cellules planctoniques étant clairement différenciables des cellules du biofilm. D'autre part, les milieux de culture utilisés pour la croissance des biofilms n'ont engendré aucun artefact d'observation.

Un double marquage a été effectué en associant Syto[®] 9 et Iodure de Propidium (IP, kit LIVE/DEAD[®] BacLight™, Molecular Probe, Invitrogen, Eugene, OR ; 0,5 µL par puits). L'IP est un agent intercalant des acides nucléiques incapable de diffuser au travers des membranes cellulaires intactes et qui marque donc uniquement les cellules dont les membranes sont endommagées (dont une majorité de cellules mortes) et les acides nucléiques extracellulaires.

En double marquage, les cellules viables cultivables et non cultivables (VBNC), dont la membrane est intègre, apparaissent vertes alors que les cellules dont la membrane est endommagée apparaissent majoritairement orange/rouge, du fait d'un déplacement de la

fluorescence du Syto[®] 9 par l'IP. D'après Ohno *et al.* (2003), le kit LIVE/DEAD[®] BacLight[™] est adapté à la détection de la viabilité de *L. pneumophila* dans l'eau.

III.3.2.4.2 Marquage des carbohydrates de la matrice du biofilm

Des polysaccharides extracellulaires entrent souvent dans la composition de la matrice de biofilms. Pour vérifier leur présence dans le biofilm de *L. pneumophila*, un marquage par une lectine, la Concanavalline A (ConA) a été réalisé. Les lectines sont des protéines issues principalement de plantes légumineuses, mais aussi de champignons ou d'invertébrés et qui ont la capacité de lier spécifiquement certains résidus osidiques. La ConA (issue de *Canavalia ensiformis*) a une affinité pour les résidus α -mannopyranosyl et α -glucopyranosyl des molécules hydrocarbonées. Elle a été couplée à l'Alexa 633, un fluorochrome, pour former la ConA-A633 (Invitrogen), visible par fluorescence.

Le protocole de marquage a été adapté de la méthode décrite par Neu *et al.* (2001). Les puits contenant les biofilms ont été vidés délicatement et 1 mL de ConA-A633 (100 μ g/mL, dans une solution de 0.1 M de bicarbonate de sodium, selon les instructions du fournisseur) a été ajoutée, de manière à recouvrir la totalité du puits, ce qui représente environ 10 μ g/cm² de ConA-A633. Les microplaques ont ensuite été incubées à température ambiante et à l'obscurité pendant 20 min, puis vidées et rincées délicatement 2 fois, avec 1 mL d'EDS. 6 mL d'EDS ont ensuite été ajoutés ainsi que 0,5 μ L de Syto[®] 9 avant de procéder aux observations.

III.3.2.4.3 Aquisition d'images en microscopie confocale

Les observations ont été réalisées avec un microscope confocal TCS SPII (Leica, Heidelberg, Allemagne), équipé d'un objectif $\times 40$ à immersion d'eau (HCX PL APO water, N.A. 0.8). L'objectif a été directement plongé dans le puits contenant le biofilm à observer. La longueur d'onde utilisée pour l'excitation du Syto[®] 9 était de 488 nm (laser Argon). La fluorescence émise a été collectée entre 498 et 533 nm. Pour l'IP, le laser Hélium-Néon a été utilisé (longueur d'onde 543 nm) et la fluorescence émise collectée entre 553 et 623 nm. La ConA-A633 a été excitée grâce au laser Hélium-Néon (longueur d'onde 633 nm) et la fluorescence émise a été collectée entre 642 and 733 nm. Les échantillons ont été scannés dans la direction xy et le pas entre 2 images était de 1 μ m.

III.3.2.4.4 Analyses d'images

Les séries d'images enregistrées au format leica (.lei) ont été analysées grâce au logiciel Image J, disponible librement sur internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Image J est un système ouvert dont les fonctions sont des extensions (ou plugins) Java. Des systèmes d'acquisition, d'analyse, et de traitement d'images personnalisés peuvent ainsi être développés par les utilisateurs, en utilisant l'éditeur Image J et Java. Les analyses d'images décrites dans cette étude ont été réalisées grâce aux extensions « Volume Viewer », « Ortview » et « Volume J ».

Plusieurs types d'images ont ainsi été obtenues (voir Figure III-6) :

- ⇒ Des aplatissements, ou « écrasements » verticaux, superposition de toutes les images d'une même série (projections maximales). Le résultat est une image dont les côtés représentent les coordonnées x et y ;
- ⇒ Des « écrasements » de profil, dont les côtés représentent un axe x-z ;
- ⇒ Des reconstitutions volumiques : les données selon x, y et z de toutes les images d'une série sont synthétisées en 3 dimensions.

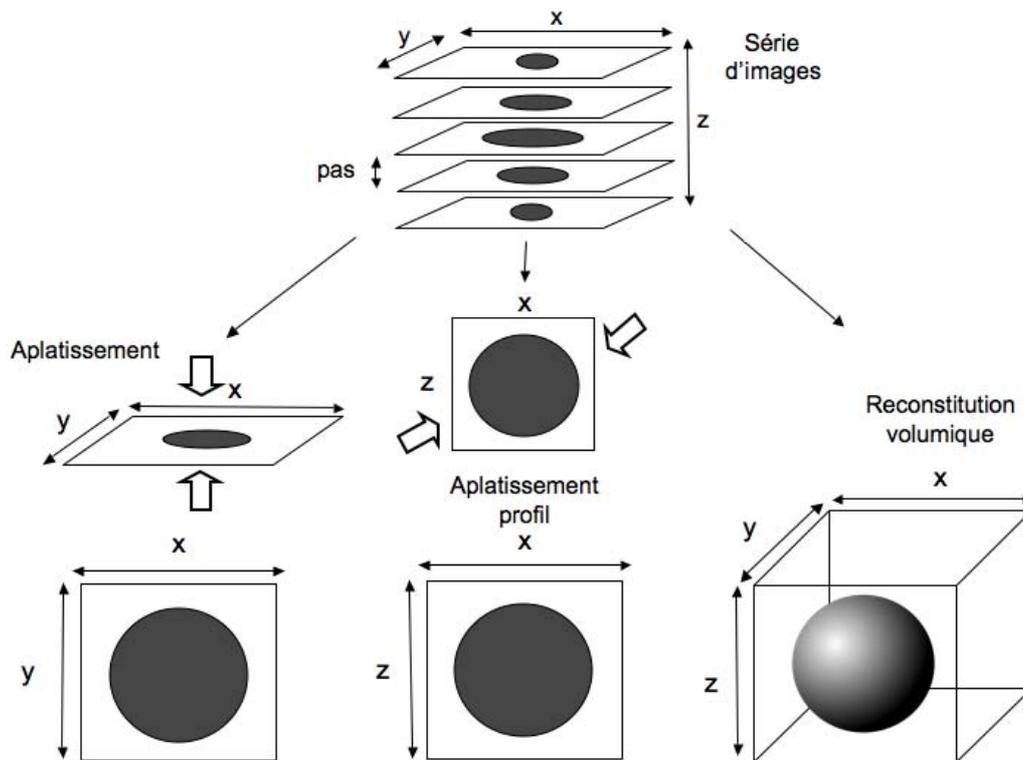


Figure III-6. Schéma du principe de l'analyse d'image

III.3.2.5 Analyses statistiques

Les quantifications bactériennes sont des moyennes effectuées sur 2 essais. Les valeurs obtenues à différents temps, dans différentes conditions de culture (température) ou pour différentes espèces ont été comparées au moyen du test *t* de Student réalisé à l'aide du logiciel MS Excel. Des valeurs de *p* inférieures ou égales à 0,01 indiquent des résultats statistiquement différents.

III.3.3 Évaluation in vitro de l'effet bactéricide à court et à moyen terme d'un choc thermique à 80 °C sur biofilms à *L. pneumophila*

Des biofilms de *L. pneumophila* (souche HW S2-14) de 9 j ont été obtenus selon le protocole déjà décrit, en utilisant le milieu SBB, et un inoculum de 10² UFC/mL. Pour chaque microplaque, un témoin positif a été effectué (puits inoculé non exposé au traitement) ainsi qu'un témoin négatif (puits non inoculé).

La microplaque a été incubée 9 j à 37±2 °C, en sachet fermé afin de limiter l'évaporation. Le milieu de culture a été renouvelé 3 et 6 j après inoculation : les puits sont vidés délicatement, rincés deux fois avec 2 mL d'EDS puis ont reçu 2 mL de milieu SBB neuf.

Le traitement biocide a été appliqué après 9 j d'incubation, sur des biofilms considérés comme matures. Les microplaques ont été fermées hermétiquement et placées au bain-marie à 80 °C pendant 1 h, excepté les microplaques contenant les puits témoins qui n'ont subi aucun traitement.

Les prélèvements de biofilm ont été effectués en suivant le protocole décrit au chapitre III.3.2.2. Pour évaluer la recolonisation du milieu par des bactéries qui auraient résisté au traitement, de nouveaux prélèvements ont été effectués 3 et 6 j après choc thermique.

Les essais ont été validés lorsque aucune bactérie n'a été détectée dans le puits témoin négatif

et que le nombre de bactéries adhérees dans les puits témoins positifs dépassait 5,5 log d'UFC/puits. L'efficacité de la désinfection a été exprimée en réduction logarithmique (RL). La RL pour les cellules en biofilm a été obtenue en retranchant le nombre d'UFC moyen des puits n'ayant pas subi de traitement (témoins positifs) au nombre de log d'UFC restant dans les puits ayant subi le choc thermique.

III.4 Évaluation *in situ* de l'effet bactéricide à court et à moyen terme d'un choc thermique à 80 °C sur une contamination à *L. pneumophila*

Deux essais *in situ* ont été réalisés sur le réseau d'EMN contaminé. Le protocole utilisé a été adapté du protocole utilisé pour *P. aeruginosa* décrit au chapitre III.2.

III.4.1 Préparation de l'inoculum et inoculation du réseau-pilote

Compte tenu du caractère fastidieux de la culture de *L. pneumophila*, le milieu R2A n'a pas pu être utilisé pour la préparation de l'inoculum. Le milieu de culture classique, BYE (Ristroph *et al.*, 1980), a été utilisé. L'inoculum a été préparé à partir de colonies de *L. pneumophila* (souche HW S2-14) issues d'un repiquage sur BCYE (1^{er} repiquage après décongélation) et mises en suspension dans 5 mL d'EDS. Cette suspension a été transvasée dans un Erlenmeyer contenant 50 mL de milieu BYE puis incubée sous agitation magnétique (400 rpm) pendant 24 h à 37±2 °C. Cette culture a ensuite été transvasée dans 1 L de milieu neuf. L'incubation s'est poursuivie pendant 12 h. La suspension bactérienne obtenue a alors été centrifugée à 4500 rpm pendant 10 min, à température ambiante. Le culot bactérien a été remis en suspension dans 300 mL d'EDS. L'opération a été renouvelée 3 fois pour éliminer au maximum le milieu de culture. La concentration bactérienne a été mesurée par étalement de 100 µL d'échantillon (et des dilutions décimales suivantes) sur BCYE+cystéine. Cette concentration s'élevait alors à $(6,55 \pm 0,64) \times 10^6$ UFC/mL. L'inoculum ainsi préparé a été versé dans le ballon du réseau-pilote contenant 400 L d'EMN à 40 °C. L'eau contaminée a ensuite été mise en circulation dans l'ensemble du réseau pendant 30 min puis mise à stagner pendant 48 h afin de favoriser l'adhésion des cellules et, éventuellement, la formation d'un biofilm.

III.4.2 *Prélèvements et analyses*

Les prélèvements et analyses effectués sont décrits dans la partie III.2.2, exceptés les dénombrements de *L. pneumophila* qui ont été effectués seulement par qPCR : les robinets de prélèvement ont été flambés au chalumeau pendant quelques secondes. Après refroidissement du robinet, le premier jet a été éliminé puis 1 L d'EMN a été collecté dans un flacon de polyéthylène haute densité (ADL Prochilab). Les échantillons d'eau pour les analyses de *L. pneumophila* ont été filtrés sur membranes de polycarbonate stérile (porosité nominale 0,45 µm, Pall) et ces membranes ont été conservées à -20 °C pendant moins d'une semaine. Les quantifications ont été réalisées par qPCR selon le protocole décrit dans la partie III.3.2.2.2. Les résultats expriment la concentration moyenne (en log UG/L) sur les onze points de prélèvement.

III.4.3 *Traitement de désinfection par choc thermique*

Les chocs de désinfection thermiques ont été effectués selon le protocole décrit paragraphe III.2.3.1.

CHAPITRE IV

*Validation des protocoles
utilisés en milieu thermal
vis-à-vis de P. aeruginosa*

IV.1 Introduction

L'objectif du présent travail était d'évaluer l'efficacité de plusieurs protocoles de désinfection utilisés en milieu thermal en premier lieu par une technique classique (NF EN 1040) puis sur biofilms obtenus selon une méthode innovante de formation en microplaques. La comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes permettra de vérifier l'intérêt de techniques alternatives, correspondant à des essais de phase 2, plus représentatives de la pratique que les méthodes sur suspensions. Pour finir, des essais ont été menés sur un réseau « eau thermale », en conditions réelles, pour vérifier l'intérêt de l'utilisation des deux méthodes *in vitro* par rapport aux résultats obtenus *in situ*. La bactérie retenue pour ces essais est *P. aeruginosa*, qui compte parmi les bactéries les plus problématiques au niveau des réseaux d'EMN.

IV.2 Validation de l'activité bactéricide des traitements de désinfection sur cellules en suspension

En premier lieu, l'activité bactéricide de base a été validée pour chaque traitement, afin de vérifier les conditions d'utilisation préconisées par les fournisseurs ou, dans le cas du choc thermique, par la réglementation du 19 juin 2000, relative à la gestion du risque microbien dans les établissements thermaux. Quatre traitements ont été testés :

- Le choc thermique à 80 °C ;
- Un choc chloré (hypochlorite de sodium) ;
- Un traitement par le peroxyde d'hydrogène associé à des ions argents (Sanosil ®) ;
- Un traitement par le polyhexaméthylène biguanide (PHMB).

Les protocoles utilisés ici ont été adaptés de la norme NF EN 1040, qui consiste à faire subir à une suspension bactérienne le traitement à tester à des temps de contact déterminés. Pour être bactéricide, le traitement doit être efficace sur une suspension de *P. aeruginosa* et une suspension de *S. aureus*. Ici, l'objectif étant de comparer ces résultats aux résultats obtenus sur biofilms de *P. aeruginosa* (qui colonise plus fréquemment les réseaux d'eau), les essais sur *S. aureus* n'ont pas été effectués.

IV.2.1 *Choc thermique*

Le choc thermique est le moyen privilégié de désinfection des réseaux d'eau. Sa mise en œuvre est peu coûteuse, puisqu'il n'engendre pas d'achat de produit biocide onéreux, et ne nécessite pas de rinçage au sens strict du terme (simple retour de l'EMN et abaissement de la température). Les évaluations de traitements biocides ont démarré par l'évaluation du choc thermique du fait de son utilisation très répandue dans les établissements thermaux. Il a donc servi de référence pour la suite des essais.

En pratique, un choc thermique est réalisé par le chauffage d'EAP à 80 °C, mise en circulation dans le réseau à désinfecter pendant une heure. Ici, l'évaluation du choc thermique a été basée sur le protocole décrit par la norme NF EN 1040. Brièvement, une suspension de *P. aeruginosa* souche PAO1 d'environ 10^7 UFC/mL dans de l'eau physiologique stérile a été placée dans un bain-marie à 80 °C. Rappelons qu'une RL supérieure ou égale à 5 log permet de qualifier le traitement testé de bactéricide, à la concentration, à la température et aux temps de contact testés. Deux temps ont été testés : 5 min et 1 h (5 minutes selon les préconisations de la norme NF EN 1040 et 1 h pour ce qui est des recommandations de la réglementation du 19 juin 2000). Les numérations effectuées par dénombrement sur gélose avant et après choc ont permis de mesurer la RL engendrée par le traitement. Les résultats sont présentés dans le Tableau IV-1.

Tableau IV-1. Réductions logarithmiques (moyennes \pm écarts-types) engendrées par traitement thermique sur cellules en suspension de *P. aeruginosa* PAO1 (n=2).

Nombre initial d'UFC dans la suspension testée (log UFC/mL)	RL après 5 min (log)	RL après 1 h (log)
7,31 \pm 0,18	7,31 \pm 0,18	7,31 \pm 0,18

Lors de ces essais, aucune bactérie cultivable résiduelle n'a été détectée après le traitement thermique. La RL est donc maximale (7,31 \pm 0,18 log) et le traitement est considéré comme bactéricide sur cellules planctoniques, quelle que soit sa durée (5 min ou 1 h).

IV.2.2 *Traitement biocide par le Chlore*

La méthode d'évaluation du traitement chimique par le chlore a été basée sur le protocole de la norme NF EN 1040. Une suspension de *P. aeruginosa* souche PAO1 d'environ 10⁷ UFC/mL a été mise en contact avec des solutions chlorées de 0,1, 1, 10 et 50 ppm, pendant 5 min ou 1 h. L'étape de neutralisation a permis les dénombrements bactériens avant et après choc et le calcul des RL engendrées par les traitements. Les valeurs observées pour chaque couple concentration/temps de contact sont présentées dans la Figure IV-1.

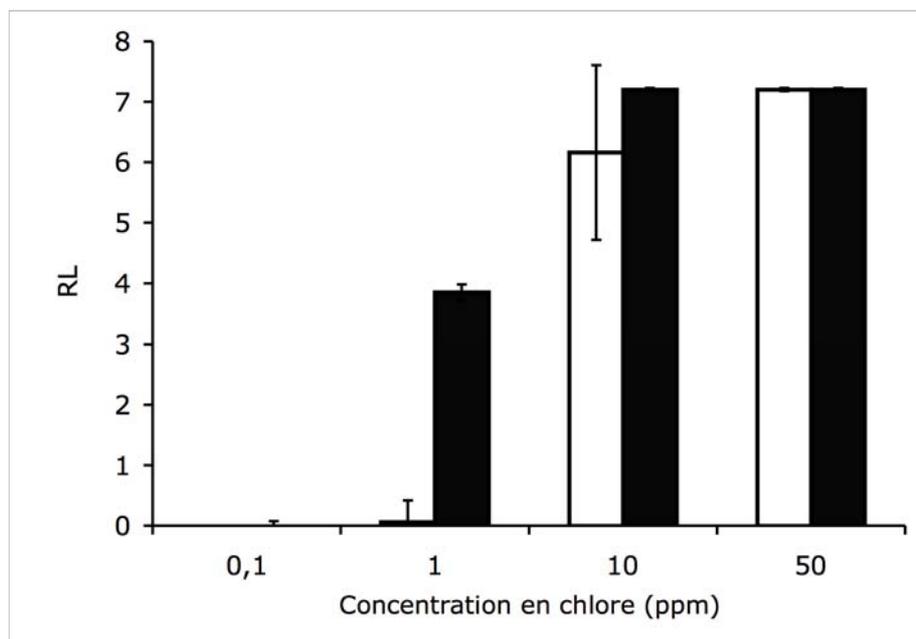


Figure IV-1. Réductions logarithmiques (moyennes \pm écarts-types) engendrées par le chlore sur cellules planctoniques de *P. aeruginosa* PAO1 (n=2). Blanc, temps de contact de 5 min. Noir, temps de contact de 1 h.

Lorsque le produit est utilisé à la concentration de 0,1 ppm, les dénombrements sont identiques avant et après traitement. Cette concentration est donc inactive sur cellules planctoniques de *P. aeruginosa*, quel que soit le temps de contact testé. Elle n'a pas été retenue pour la suite des essais.

À 1 ppm, on note un effet progressif sur cellules de *P. aeruginosa*. L'effet de la molécule n'est pas immédiat : après 5 min, la RL est toujours indétectable. Après 1 h de contact, la RL moyenne est de $3,85 \pm 0,14$ log et n'atteint toujours pas le seuil critique des 5 log. Ce traitement n'est pas considéré comme bactéricide.

Les résultats montrent que seules des concentrations supérieures ou égales à 10 ppm de chlore permettent une élimination convenable de *P. aeruginosa*. À 10 ppm, on observe un effet dépendant du temps : la RL obtenue après 5 min de traitement est supérieure à 5 log, mais quelques cellules cultivables persistent (réduction de $6,16 \pm 1,44$ log, n=2), alors qu'après 1 h, aucune cellule n'est détectée dans la suspension et la désinfection est maximale (RL > 7 log). Le traitement de 50 ppm en revanche est efficace dès 5 min de traitement puisque aucune

UFC n'est détectée ($RL > 7 \log$).

IV.2.3 *Traitement biocide par le Sanosil®*

La méthode d'évaluation d'un choc chimique par le Sanosil® a été effectuée de la même manière que pour le chlore, en suivant le protocole décrit par la norme NF EN 1040. Les concentrations choisies étaient de 50, 500 et 1000 ppm d' H_2O_2 pour des temps de contact de 5 min et 1 h. Les résultats sont présentés dans la Figure IV-2.

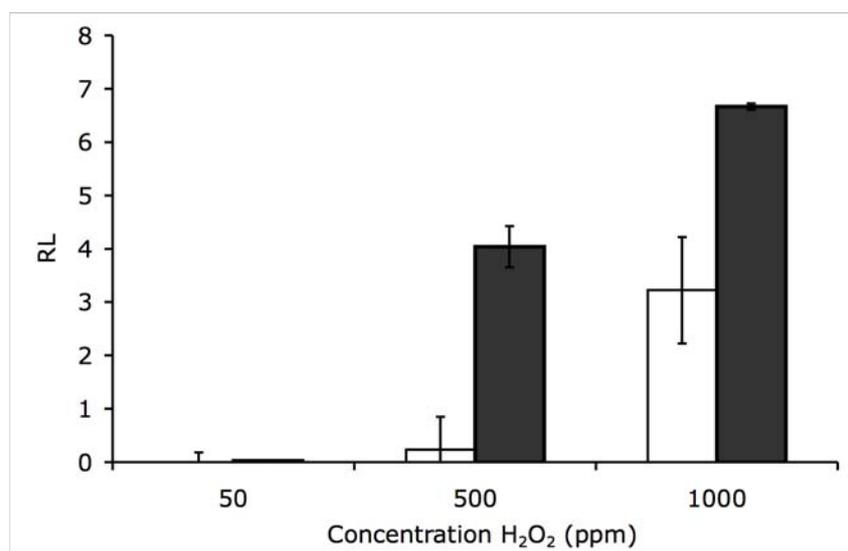


Figure IV-2. Réductions logarithmiques (moyennes ± écarts-types) engendrées par le Sanosil® (en ppm d' H_2O_2) sur cellules planctoniques de PAO1 (n=2). Blanc, temps de contact 5 min. Noir, temps de contact 1 h.

La concentration de 50 ppm est inactive sur les cellules planctoniques de *P. aeruginosa*, quel que soit le temps de contact testé. Elle n'a donc pas été retenue pour la suite des essais.

À 500 ppm, l'effet est dépendant du temps puisque après 5 min de traitement, aucun effet significatif du traitement n'est détecté ($RL=0,23\pm 0,61 \log$). La RL observée après 1 h de contact est de $4,04\pm 0,38 \log$ pour une concentration de 500 ppm. Un traitement de 1 h ne permet pas de dépasser le seuil critique des 5 log. Cette concentration n'est donc pas considérée comme bactéricide aux temps de contact testés.

Les résultats montrent que seule une concentration de 1000 ppm en H₂O₂ permet une élimination significative de *P. aeruginosa* souche PAO1. L'effet du produit est également dépendant du temps : la RL est de seulement 3,22±1,00 log après 5 min de traitement alors qu'elle est maximale (6,67±0,06 log) après 1 h. Un temps de contact de 1 h est donc nécessaire pour ne plus détecter de bactérie viable dans la suspension.

IV.2.4 *Traitement biocide par le Poly-HexaMéthylène Biguanide*

L'évaluation du PHMB a été effectuée en suivant le protocole décrit par la norme NF EN 1040. Les concentrations testées sont de 25, 35 et 250 ppm, pour deux temps de contact : 5 min et 1 h. Les résultats sont présentés dans la Figure IV-3.

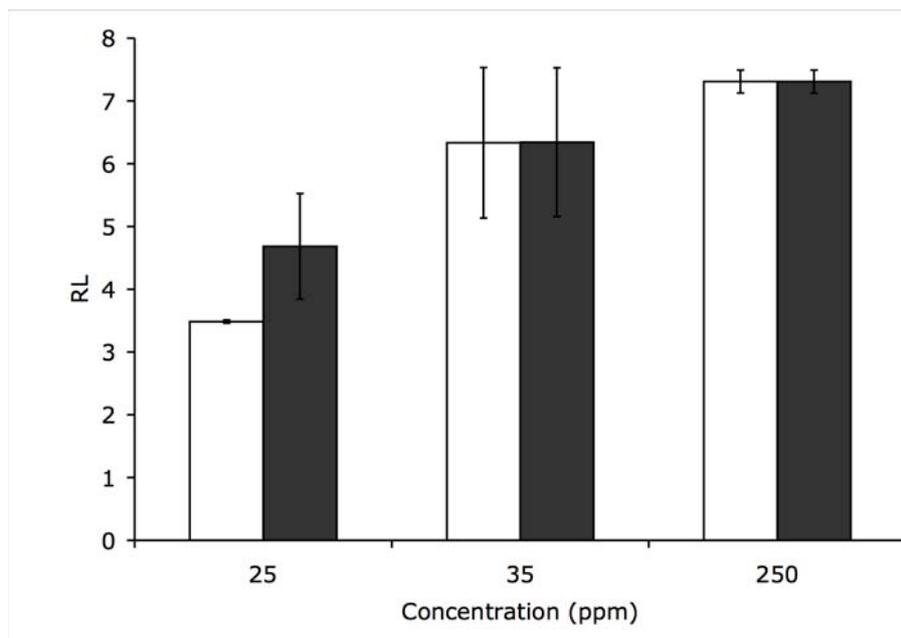


Figure IV-3. Réductions logarithmiques (moyennes ± écarts-types) engendrées par le PHMB sur PAO1 en suspension (n=3). Blanc, temps de contact 5 min. Noir, temps de contact 1 h.

Tous les couples concentrations / temps de contact testés ici induisent une réduction des cellules planctoniques de *P. aeruginosa*.

À une concentration de 25 ppm, le PHMB a un effet dépendant du temps : après 5 min de traitement, la RL est de $3,48 \pm 0,03$ log et de $4,68 \pm 0,84$ log à 1 h. Le seuil des 5 log n'étant pas atteint, cette concentration n'est pas considérée comme bactéricide.

À 35 ppm, les RL observées aux 2 temps de contact sont supérieures à 5 log : $6,34 \pm 1,18$ log à 5 min et $6,33 \pm 1,20$ log à 1 h. Il est intéressant de noter que l'effet du PHMB à cette concentration ne semble pas dépendant du temps, donc que la molécule a un effet rapide sur les cellules. Même si les RL sont toujours supérieures à 5 log, on remarque une forte variabilité entre les essais et la persistance de cellules viables après traitement.

Le PHMB appliqué à une concentration de 250 ppm permet de ne détecter aucune bactérie dans la suspension après traitement : les RL engendrées sont supérieures ou égales à 7 log pour les deux temps de contact testés, ce qui correspond à un effet bactéricide maximum. On constate également que l'effet du traitement est immédiat puisque aucune bactérie n'est détectée après 5 min.

IV.3 Validation in vitro des protocoles de désinfection utilisés en milieu thermal sur biofilms de *P. aeruginosa*

Le Laboratoire de Microbiologie Industrielle dispose d'une méthode d'obtention de biofilms de *P. aeruginosa* en microplaque. Cette méthode, utilisant un milieu de culture appauvri en nutriments (MBB) permet la croissance des bactéries adhérees entraînant la formation de microcolonies et non une croissance planctonique suivie d'un dépôt. Ainsi ce protocole permet, même s'il est réalisé *in vitro*, de se rapprocher des conditions de formation d'un biofilm environnemental. Qui plus est, le modèle microplaque permet de cribler rapidement plusieurs conditions de traitement et notamment de concentrations d'utilisation.

De manière générale, les temps de contact de 5 min n'ayant généré que peu ou pas de diminution des populations planctoniques, ils ont été abandonnés pour les validations sur biofilms. Lors de ces essais, des biofilms monoespèce de *P. aeruginosa* souche PAO1 de 48 h ont été formés (Figure IV-4) puis exposés à divers traitements. Les techniques de désinfection testées et validées sur bactéries en suspension ont donc été réévaluées sur biofilms.

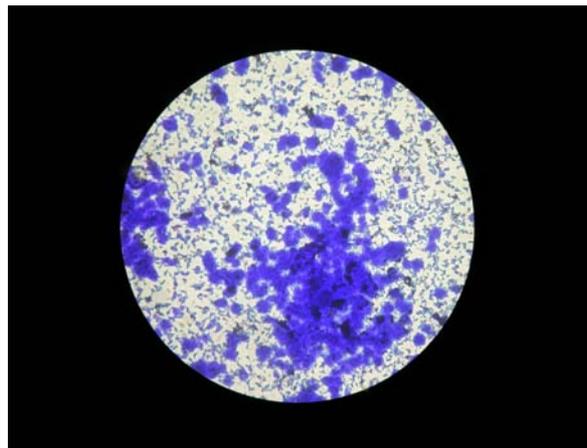


Figure IV-4. Biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 après 48 h d'incubation, observé au microscope inversé (×400) après coloration au cristal violet.

IV.3.1 *Choc thermique*

L'efficacité du choc thermique a été mesurée en plaçant les microplaques contenant des biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 au bain-marie à 80 °C pendant 1 h. Lors de ces essais, les puits non traités contenaient $6,26 \pm 0,58$ log UFC/puits. Les bactéries restant après le choc ont été dénombrées sur gélose. Les résultats sont indiqués dans le Tableau IV-2.

Tableau IV-2. Réduction logarithmique (moyenne \pm écart-type) engendrée par un choc thermique (80 °C, 1 h) sur biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 (n=4)

Nombre initial d'UFC dans les puits (log UFC/puits)	RL après 1 h (log)
$6,26 \pm 0,58$	$6,26 \pm 0,58$

Quel que soit l'essai, aucune bactérie cultivable n'a été détectée dans les puits traités par choc thermique. La RL est donc maximale (> 6 log). Tout comme sur cellules planctoniques, ce traitement est considéré comme bactéricide sur biofilms de *P. aeruginosa*.

IV.3.2 *Traitement par le chlore*

Pour évaluer l'efficacité du chlore sur biofilms de *P. aeruginosa* souche PAO1, des biofilms de 48 h ($7,66 \pm 0,05$ log UFC/puits) ont été mis en contact avec des solutions chlorées pendant 1 h. Les concentrations choisies sont celles déjà validées sur cellules planctoniques, à savoir 1, 10 et 50 ppm. Après rinçage, les bactéries viables résiduelles après le traitement ont été récupérées par grattage des puits. Les dénombrements sur gélose ont permis, par comparaison avec les puits non traités, de calculer les RL engendrées par les traitements. Ces résultats sont donnés dans la Figure IV-5.

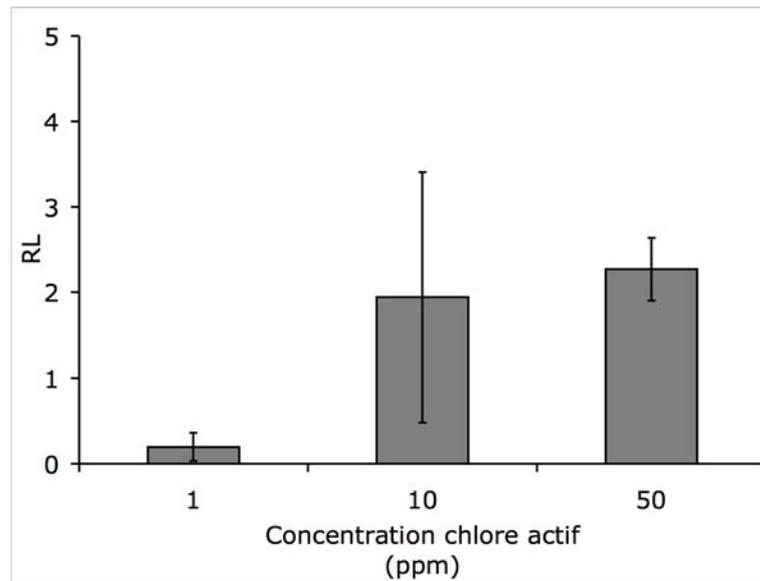


Figure IV-5. Réductions logarithmiques (moyennes ± écarts-types) engendrées par des traitements chlorés sur biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 (n=3)

Après 1 h de traitement par le chlore à 1 ppm, on ne note pas d'effet significatif sur biofilms de *P. aeruginosa* : la RL observée est de $0,20 \pm 0,17$ log. À la concentration de 10 ppm, la RL engendrée est de $1,94 \pm 1,46$ log. L'écart-type observé pour ces essais montre qu'à cette concentration l'effet sur le biofilm est peu reproductible. À 50 ppm, on observe une activité plus reproductible sur le biofilm, mais la réduction logarithmique engendrée est seulement de $2,27 \pm 0,38$ log.

Dans tous les cas, le seuil critique de 5 log n'étant jamais atteint, aucun traitement testé n'est considéré comme bactéricide sur biofilms de *P. aeruginosa*. Ces résultats contrastent nettement avec les résultats obtenus sur cellules planctoniques qui démontraient une activité bactéricide des concentrations 10 et 50 ppm après une heure de contact (RL > 7 log).

IV.3.3 Traitement par le Sanosil ®

Pour évaluer l'efficacité du Sanosil ®, des biofilms ($7,66 \pm 0,05$ log UFC / puits) ont été mis en contact avec des solutions à 500 et 1000 ppm d' H_2O_2 , pendant 1 h. Ces concentrations correspondent aux concentrations actives sur cellules planctoniques, même si 500 ppm en H_2O_2 pendant 1 h ne permettaient pas d'atteindre une RL de 5 log.

Après rinçage, les bactéries viables ayant résisté aux traitements ont été récupérées par grattage des puits et dénombrées sur gélose. La comparaison avec les puits non traités a permis d'évaluer les RL engendrées par les traitements (voir Figure IV-6).

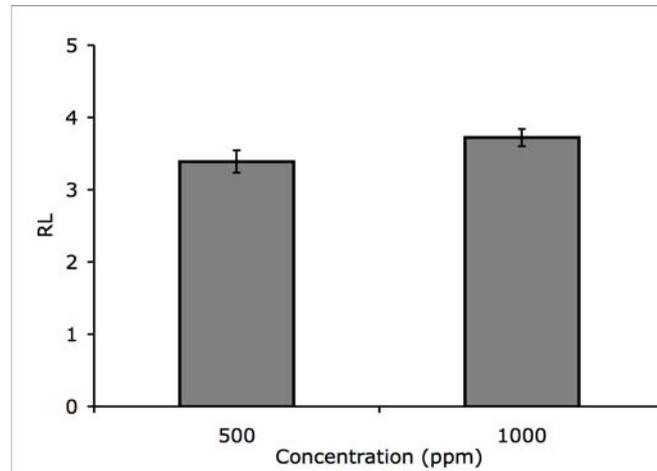


Figure IV-6. Réductions logarithmiques (moyennes ± écarts-types) engendrées par le Sanosil ® (en ppm d'H₂O₂) sur biofilms de *P. aeruginosa* souche PAO1 (n=2).

Après 1 h de traitement par le Sanosil ® à 500 ppm, on note une réduction logarithmique significative sur biofilms de *P. aeruginosa*, la RL observée étant de $3,39 \pm 0,16$ log. Il est intéressant de noter qu'à cette concentration, les RL sur cellules planctoniques et biofilms sont proches : $4,04 \pm 0,38$ log sur cellules planctoniques, contre $3,39 \pm 0,16$ log sur biofilm. La perte d'activité liée à la présence d'un biofilm est faible à cette concentration.

À la concentration de 1000 ppm, l'effet du Sanosil ® est légèrement augmenté, puisque la RL engendrée est de $3,72 \pm 0,12$ log. On notera cependant qu'il n'y a pas de différence significative entre les valeurs observées à 500 et 100 ppm ($p > 0,01$) par opposition aux résultats obtenus sur cellules planctoniques. Ce résultat pourrait indiquer que le Sanosil ® n'a d'activité bactéricide que sur certaines populations du biofilm de *P. aeruginosa* et que l'augmentation de concentration ne permet pas de meilleurs résultats.

Même à la plus forte concentration testée, il reste plus de 4 log UFC dans les puits après traitement. Le seuil critique de 5 log UFC éliminés par les désinfections n'étant pas atteint, ces traitements ne sont pas considérés comme bactéricides sur biofilms de *P. aeruginosa*.

IV.3.4 Traitement biocide par le PHMB

Pour évaluer l'efficacité du PHMB sur biofilms de *P. aeruginosa* souche PAO1, des biofilms ($6,85 \pm 0,94$ log UFC / puits) ont été mis en contact avec des solutions de PHMB à 25, 35 ou 250 ppm (concentrations ayant un effet sur cellules planctoniques) pendant 1 h. Après rinçage, les bactéries restantes après le traitement ont été récupérées par grattage des puits. Les dénombrements sur gélose ont permis, par comparaison avec les puits non traités, de calculer la RL engendrée par les traitements. Les résultats sont indiqués dans la Figure IV-7.

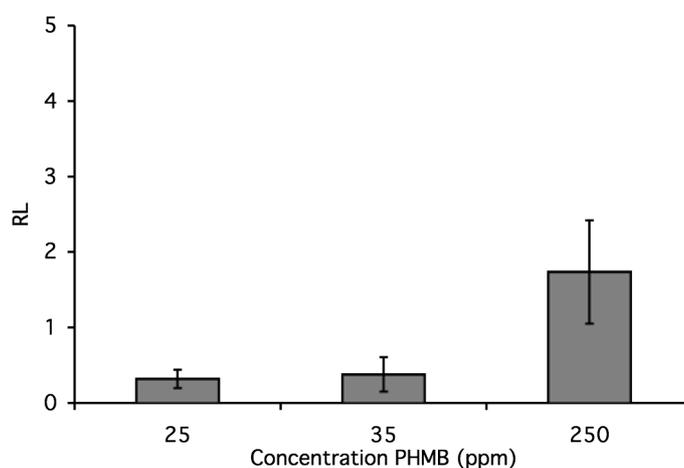


Figure IV-7. Réductions logarithmiques (moyennes ± écarts-types) engendrées par le PHMB sur biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 (n=4).

Après 1 h de traitement par le PHMB à 25 ppm ou 35 ppm, on note des RL non significatives de $0,32 \pm 0,12$ et $0,38 \pm 0,23$ log respectivement : ces concentrations de PHMB sont inactives sur les cellules du biofilm. Un effet plus important est observé lorsque le PHMB est utilisé à une concentration de 250 ppm : la réduction logarithmique est alors de $1,73 \pm 0,68$ log UFC.

De manière générale, le PHMB ne peut être considéré comme bactéricide aux concentrations testées sur biofilms de *P. aeruginosa* ($RL < 5$ log), et ce malgré leurs validations par la méthode NF EN 1040.

L'ensemble des essais menés *in vitro* sur la souche PAO1 a révélé des propriétés bactéricides variables des traitements selon l'état des bactéries testées (planctoniques ou en biofilm).

Comme attendu, le choc thermique a abouti à de bons résultats, quel que soit le temps de contact, tant sur cellules planctoniques qu'en biofilms. Cette méthode a donc été sélectionnée en priorité pour les essais sur réseau d'EMN.

A contrario, les traitements chimiques ayant montré une bonne efficacité sur cellules planctoniques se sont avérés nettement affectés lorsque les bactéries sont sous forme biofilm. Cette diminution d'activité est particulièrement visible pour les traitements chlorés et par le PHMB qui atteignent au maximum une RL de 2 log sur biofilms. La diminution d'activité est plus nuancée dans le cas du Sanosil ®, particulièrement à la concentration de 500 ppm pour laquelle les RL sont proches sur cellules planctoniques et sur biofilm (environ 3,5 log). Cependant, l'augmentation de la concentration en Sanosil ® ne permet pas d'améliorer l'activité bactéricide sur biofilm, ce qui pourrait signifier que ce traitement aurait une activité limitée à une fraction de la population à l'intérieur du biofilm.

Ces essais démontrent l'importance de la mise en place de méthodes alternatives pour la détermination de l'activité bactéricide des traitements utilisés pour la désinfection des réseaux d'eau minérale naturelle. La méthode *in vitro* utilisée ici permet de mesurer l'impact de la forme biofilm sur l'évaluation des traitements. Dans le but de vérifier si cette technique est un bon préambule à l'utilisation de traitements sur un véritable réseau, des essais *in situ* ont été réalisés sur un réseau-pilote alimenté en EMN. Ces essais font l'objet du paragraphe IV.4.

IV.4 Validation des traitements de désinfection sur réseau-pilote contaminé par *P. aeruginosa*

Les essais effectués *in vitro* ont été étendus à des essais sur réseau-pilote alimenté en EMN, lequel permet de s'approcher des conditions de traitement dans un réseau d'établissement thermal. Compte tenu du temps imparti pour la réalisation des tests, seuls un traitement thermique et un traitement par PHMB ont pu être testés. Ces résultats sont aussi décrits dans un article paru dans la « Presse Thermale et Climatique » (Annexe 6). La souche choisie pour ces essais est un isolat environnemental, issu d'un réseau d'EAP, plus adapté au milieu aquatique que la souche PAO1.

IV.4.1 Évolution naturelle de la flore du réseau-pilote

Avant réalisation des traitements de désinfection, des essais préliminaires ont été effectués afin de maîtriser les paramètres pouvant influencer sur les résultats des essais de désinfection.

L'évolution naturelle de la flore au sein du réseau a d'abord été déterminée pour vérifier si des proliférations anormales de la flore endogène ou de micro-organismes témoins de contamination fécale ou potentiellement pathogènes (coliformes, entérocoques, *P. aeruginosa*, *L. pneumophila*) pouvait en altérer les résultats.

Le réseau-pilote a préalablement été désinfecté par choc thermique à 80 ± 5 °C pendant 15 h (EAP). Il a ensuite été mis en eau (EMN de Dax) et utilisé en circuit ouvert 1 h par jour pour mimer l'utilisation d'un réseau d'établissement thermal. La colonisation du réseau a été suivie par des analyses microbiologiques menées pendant 4 semaines. Aucun coliforme (dans 250 mL), entérocoque (dans 250 mL), spore de bactérie anaérobie sulfite-réductrice (dans 100 mL), *P. aeruginosa* (dans 250 mL) ou *L. pneumophila* (dans 1 L) n'a été détecté pendant cette période.

La Figure IV-8 présente les concentrations moyennes en FT 37 et FT 22 aux différents points de prélèvement du réseau, obtenues sur 5 temps de prélèvements différents. Le graphique fait apparaître des variations des concentrations bactériennes en fonction du point de prélèvement : la FT 37 varie de $1,91\pm 1,24$ log UFC/mL (point 4) à $2,80\pm 0,50$ log UFC/mL

(point 9) et la FT 22 varie de $0,10 \pm 0,21$ log UFC/mL (point 4) à $1,99 \pm 0,74$ log UFC/mL (point 6). Plus particulièrement, il semble que les points 1 à 4 soient moins contaminés que les points 4 à 11. Toutefois, ces variations ne sont pas significatives. On peut donc considérer que les paramètres microbiologiques sont stables dans l'ensemble du réseau.

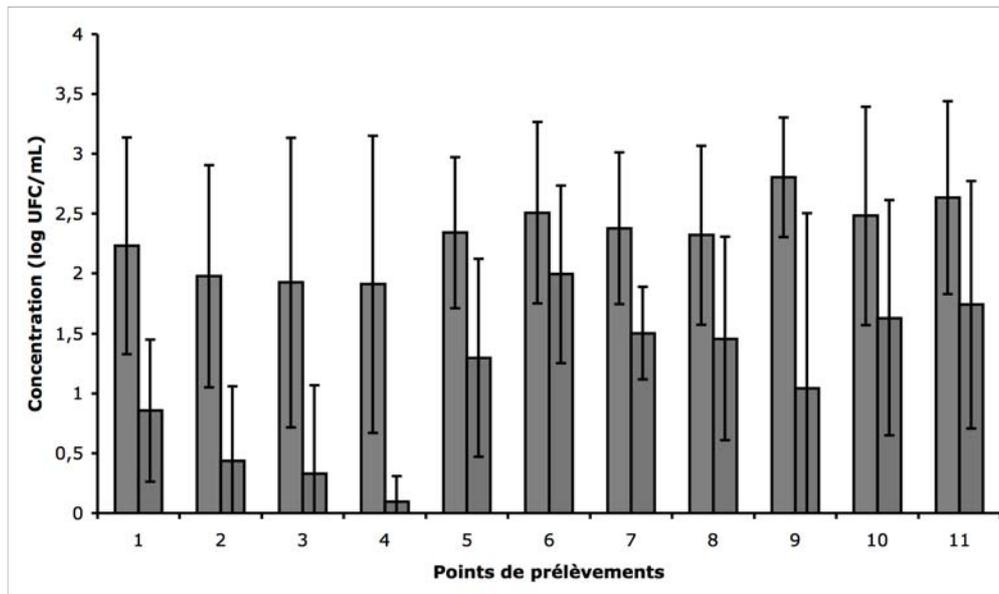


Figure IV-8. Concentrations moyennes et écarts-types (log UFC/mL) en flores revivifiables à 37 °C (gris clair) et 22 °C (gris foncé) aux différents points de prélèvement du réseau (n=5).

La Figure IV-9 montre les variations des flores revivifiables hétérotrophes dans la totalité du réseau au cours du temps (moyennes et écarts-types effectués sur les 11 points de prélèvements). Ces concentrations varient, mais les écarts-types montrent que ces variations ne sont pas significatives au cours du temps.

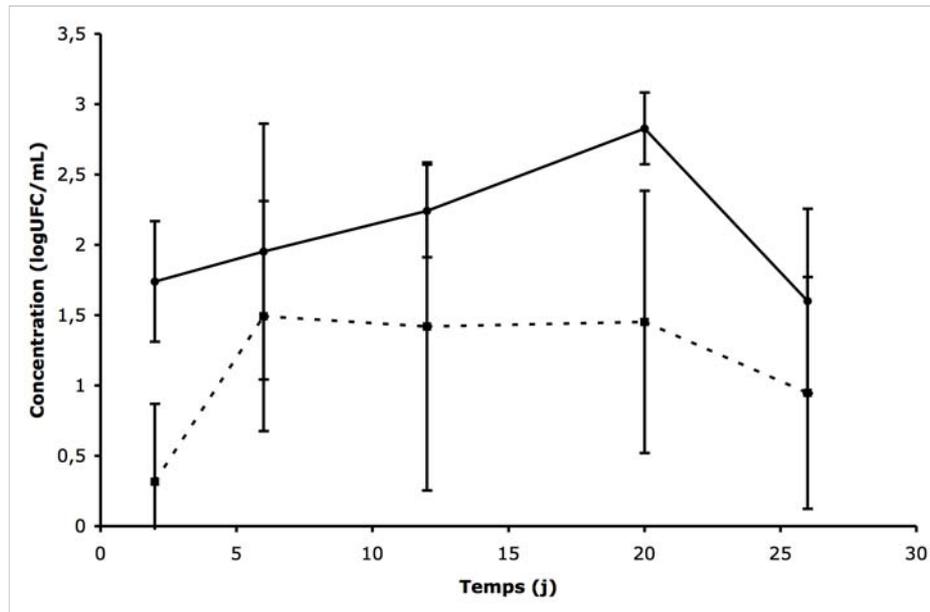


Figure IV-9. Concentrations moyennes et écarts-types (log UFC/mL) en FT 37 (trait plein) et FT 22 (trait pointillé) dans le réseau au cours du temps (n=11).

Compte tenu de ces résultats, on peut considérer que les paramètres microbiologiques sont stables dans l'ensemble du réseau sur une période de 4 semaines. Les essais ont donc pu être réalisés durant ce laps de temps, après préparation du réseau-pilote par un choc thermique à 80 ± 5 °C pendant 15 h, suivi d'une circulation quotidienne d'EMN d'une heure en circuit ouvert.

Avant chaque essai, l'efficacité de la décontamination a été validée par analyses microbiologiques de l'eau (flore hétérotrophe revivifiable, coliformes, entérocoques, spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices, *P. aeruginosa* et *L. pneumophila*).

IV.4.2 *Traitement par choc thermique*

Les essais *in vitro* ont démontré que le traitement thermique était le plus efficace des traitements testés contre une population de *P. aeruginosa* en suspension ou adhérente. Pour vérifier l'efficacité de ce traitement *in situ*, le réseau-pilote a été artificiellement contaminé par un isolat environnemental de *P. aeruginosa*. Après stabilisation de cette contamination, un traitement thermique à 80 °C a été appliqué par chauffage d'EAP mise en circulation pendant 1 h 30 dans tout le réseau (circuit fermé). Le suivi de la contamination a été réalisé au cours du temps au niveau des 11 points de prélèvement, par mesures des flores revivifiables à 37 et 22 °C (dans 1 mL d'EMN respectivement) ainsi que de *P. aeruginosa* (dans 250 mL d'EMN) selon les méthodes standard. Il est à noter qu'aucune contamination par des coliformes, des entérocoques ou des spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices ou *Legionella* n'a été détectée. Le pH, la température, la pression et les concentrations ioniques de l'EMN n'ont pas varié anormalement au cours de l'essai.

Des prélèvements de l'eau ont été effectués au jour 0 (48 h après la contamination et juste avant le traitement thermique), au jour 1 et au jour 7. La Figure IV-10 indique les résultats en termes de concentrations moyennes en FT 22, FT 37 et *P. aeruginosa* aux 11 points de prélèvements et au cours du temps.

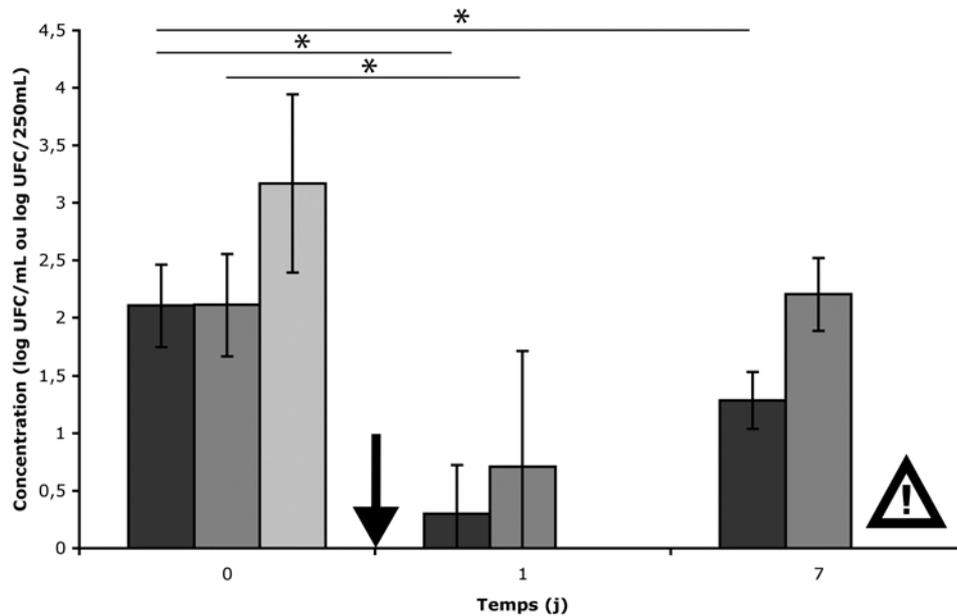


Figure IV-10. Concentrations en flores revivifiables (FT 22, gris foncé, FT 37, gris) en log UFC/mL et concentrations en *P. aeruginosa* (gris clair) en log UFC/ 250mL dans l'EMN en circulation, avant et après désinfection par choc thermique à 80 °C (n=11). La flèche indique le choc thermique. Les astérisques indiquent des valeurs de $p < 0,01$. À J7, 4 points présentaient des contaminations par *P. aeruginosa*.

Le graphique montre que la FT 22 est affectée par le choc thermique. La concentration passe en effet de $2,11 \pm 0,35$ log UFC/mL à $0,30 \pm 0,42$ log UFC/mL ($p < 0,01$). On observe une augmentation après 7 jours ($1,29 \pm 0,25$ log UFC/mL, $p < 0,01$ par rapport à J1), mais le niveau initial n'est pas atteint 7 jours après le traitement.

On peut noter que la concentration en FT 37 est aussi affectée par le traitement puisqu'elle passe de $2,11 \pm 0,44$ log UFC/mL avant traitement, à $0,70 \pm 1,00$ log UFC/mL ($p < 0,01$). Toutefois, contrairement à la FT 22, le niveau initial est rétabli après 7 jours ($2,21 \pm 0,31$ log UFC/mL, $p > 0,01$ par rapport à J0).

En ce qui concerne *P. aeruginosa*, le protocole d'inoculation a permis une contamination uniforme du réseau, détectable à tous les points de prélèvement ($3,17 \pm 0,78$ log UFC/250 mL, voir Figure IV-10). Immédiatement après désinfection, les concentrations de *P. aeruginosa*

étaient inférieures au seuil de détection sur l'ensemble du réseau (<1 UFC/250 mL). Toutefois, une semaine après l'épisode de désinfection, la bactérie était à nouveau détectée au niveau de 4 points de prélèvement (points 5 à 8) qui présentaient des concentrations supérieures à 150 UFC/250 mL (Figure IV-10).

Ces essais révèlent que le choc thermique n'a pas une efficacité optimale en réseau : même si immédiatement après la désinfection, aucune bactérie cultivable n'a été détectée (comme lors des essais *in vitro* sur biofilms), les analyses font état d'une rapide recontamination (7 jours après le choc).

IV.4.3 **Désinfection par le PHMB**

Les tests menés *in vitro* sur la bactérie *P. aeruginosa* ont permis de vérifier que le PHMB était bactéricide à 35 et 250 ppm après 1 h de traitement sur cellules planctoniques. Sur biofilms, nous avons noté une perte de sensibilité significative. Toutefois, le fabricant revendiquant une efficacité à partir de 20 ppm pour des temps de contact supérieurs à 1 h, un traitement à 25 ppm pendant 1 h 15 a été appliqué.

De la même manière que pour l'essai traitement thermique, le réseau-pilote a été inoculé par *P. aeruginosa*, puis la désinfection par le PHMB a été appliquée (dilué dans de l'EAP). Après désinfection, le réseau a été rincé par de l'EMN (15 min, circuit ouvert), puis de l'EMN neuve a été mise en circulation quotidiennement. Le suivi de la contamination a été réalisé au cours du temps au niveau des 11 points de prélèvement, par mesures des flores revivifiables à 37 et 22 °C (dans 1 mL d'EMN respectivement), ainsi que de *P. aeruginosa* (dans 250 mL d'EMN) selon les méthodes standard. Aucune contamination par coliformes, entérocoques ou spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et *Legionella* n'a été détectée. Le pH, la température, la pression et les concentrations ioniques de l'EMN n'ont pas varié anormalement au cours de l'essai.

La Figure IV-11 indique les résultats obtenus au cours du temps, 48 h après contamination (J0), puis après désinfection (J3 et J4).

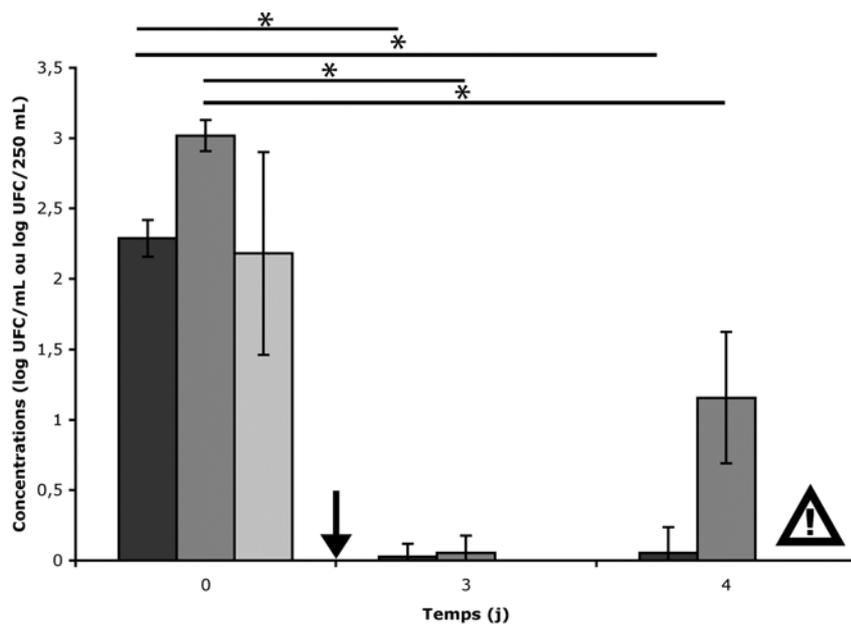


Figure IV-11. Concentrations en flores revivifiables (FT 22, gris foncé, FT 37, gris) en log UFC/mL et concentrations en *P. aeruginosa* (gris clair) en log UFC/ 250 mL dans l’EMN en circulation dans le réseau, avant et après désinfection par PHMB (25 ppm, n=11). La flèche représente le traitement de désinfection. Les astérisques indiquent des valeurs de $p < 0,01$. À J4, *P. aeruginosa* est détecté au niveau de 3 points de prélèvements.

L’effet du traitement est visible à 3 jours sur les FT 37 et FT 22, dont les concentrations sont passées respectivement de $3,02 \pm 0,11$ log UFC/mL et $2,29 \pm 0,13$ log UFC/mL à J0, à des seuils détectables mais non quantifiables à J3 ($p < 0,01$). Quatre jours après le traitement, la FT 37 n’était toujours pas revenue à sa concentration initiale ($1,16 \pm 0,47$ log UFC/mL, $p < 0,01$) et la FT 22 était toujours inférieure au seuil de détection.

Après inoculation du réseau, la concentration moyenne en *P. aeruginosa* aux 11 points de prélèvements s’élevait à $1,70 \pm 0,43$ log UFC/250 mL. Trois jours après désinfection, aucune cellule de *P. aeruginosa* n’était détectée dans le réseau. Cependant, à J4, des concentrations dépassant les taux acceptables ont été constatées au niveau de trois points de prélèvements (points 7 à 9).

Comme attendu, les résultats *in situ* montrent que le PHMB ne permet pas d’éliminer une

contamination par *P. aeruginosa*. Les essais effectués en microplaques avaient déjà démontré que le PHMB (à 25 ppm) ne permettait pas d'éliminer la totalité des cellules cultivables d'un biofilm de *P. aeruginosa* (souche PAO1).

Alors que le traitement thermique avait été caractérisé de bactéricide tant sur cellules planctoniques qu'en biofilm, l'essai mené *in situ* fait apparaître que 7 jours après la désinfection, *P. aeruginosa* est à nouveau détecté en 4 points du réseau. Dans le cas du traitement par PHMB, le même phénomène est observé, à savoir la recontamination du réseau 4 jours après désinfection, alors que les premières analyses de l'EMN étaient conformes.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à ces recontaminations et seront discutées dans le prochain paragraphe :

- La présence de *P. aeruginosa* non détectée dans l'EMN ou l'EAP alimentant le réseau ;**
- Une mauvaise efficacité du traitement lié à la présence de zones de faibles débits, ou zones mortes ;**
- La présence d'un biofilm ayant résisté aux traitements et qui aurait ultérieurement libéré de nouvelles cellules dans l'EMN en circulation. Dans les réseaux d'eau, des dépôts d'oxydation ou de tartre peuvent diminuer le transfert de chaleur et permettre la résistance des bactéries. D'autre part, des cellules fixées subissant un stress peuvent également former des VBNC (cellules viables et non cultivables) et être à l'origine de la recolonisation de l'EMN.**

IV.5 Discussion

IV.5.1 Modèle de formation de biofilm à *P. aeruginosa* en microplaque

La diminution de l'activité de traitements désinfectants sur des biofilms bactériens est un phénomène bien décrit et observé dans de nombreuses études. Les méthodes actuelles d'évaluation des biocides, notamment les méthodes standard comme la norme NF EN 1040, ne prennent pas en compte la formation de biofilms, ce qui n'est pas sans conséquence pour la désinfection des réseaux d'eaux. En effet, les bactéries potentiellement pathogènes et colonisatrices de ces réseaux ont souvent la capacité de former des biofilms. C'est le cas de la bactérie *P. aeruginosa* qui a été choisie comme modèle dans cette étude.

Pour compléter les normes de phase 1 existantes (notamment la norme NF EN 1040), une technique *in vitro* de formation de biofilm a été utilisée. Cette méthode, développée au Laboratoire de Microbiologie Industrielle, s'inspire d'autres modèles déjà décrits dans la littérature (Pitts *et al.*, 2003; Sandberg *et al.*, 2008). Entre autres, le biofilm est formé en microplaque pour permettre le criblage simultané de plusieurs composés antibactériens. Toutefois, dans cette étude, plusieurs paramètres ont été sélectionnés afin d'améliorer les conditions de formation du biofilm et faciliter l'étude de la bactéricidie des traitements biocides, notamment les conditions de croissance (inoculum, milieu de culture) et la méthode de quantification.

IV.5.1.1 Conditions de croissance du biofilms à *P. aeruginosa* en microplaques

La plupart des modèles de formations de biofilms à *P. aeruginosa* utilisent des milieux de culture riches (de type Tryptone Soja Bouillon) (Pitts *et al.*, 2003; Alt *et al.*, 2004). Dans cette étude, le milieu de culture utilisé (MBB) est appauvri en nutriments et régulièrement renouvelé, ce qui favorise la croissance des bactéries dans le biofilm tout en limitant la croissance des bactéries planctoniques (Khalilzadeh *et al.*, 2010). Les puits des microplaques sont également inoculés avec une faible quantité de bactéries (≈ 100 UFC par puits) et aboutissent à la formation de biofilms d'environ 7 log UFC/puits. Ces conditions permettent l'application des traitements de désinfection sur des cellules physiologiquement adaptées au mode de croissance adhérent et non pas sur des cellules planctoniques libres qui se seraient

ultérieurement déposées.

IV.5.1.2 Techniques de quantification des bactéries du biofilm

Les biofilms en microplaque peuvent être suivis par différents modes de quantification. La plupart des auteurs utilisent des méthodes indirectes pour des besoins de criblage rapide. Ces techniques permettent de quantifier le « biofilm total » (c'est-à-dire les bactéries mortes, vivantes et la matrice), les bactéries viables seules ou encore la matrice seule (non abordé ici) :

- Parmi les méthodes de quantification du « biofilm total », on peut citer la méthode du Cristal Violet (CV) dans laquelle le colorant est fixé sur le biofilm total puis solubilisé (par de l'éthanol par exemple). La DO de cette solution est proportionnelle à la quantité de biofilm total (cellules mortes, vivantes et matrice) dans le puits. Le Syto 9 ®, marqueur des acides nucléiques permet également la quantification du biofilm total puisqu'il marque les bactéries vivantes, mortes et l'ADN extracellulaire de la matrice. La fluorescence d'un puits de microplaque peut donc être mesurée et corrélée à la quantité de biofilm total. Ces marqueurs ne distinguant pas les bactéries mortes des vivantes (Peeters *et al.*, 2008), ils ne peuvent cependant pas être utilisés dans le but de mesurer l'efficacité de traitements désinfectants. Ce problème a notamment été identifié par Pitts *et al.* (2003). Dans cette étude, les auteurs ont comparé le marquage CV à la quantification des UFC sur gélose sur des biofilms de 24 h de *P. aeruginosa* (PAO1) formés en milieu TSB, exposés à des choc chlorés (de 1 à 1000 ppm) pendant 1 h. Les auteurs ont constaté que le CV ne permettait pas de différencier l'efficacité des différents traitements chlorés sur biofilms de *P. aeruginosa* : la réduction du marquage est la même pour tous les traitements.
- Les marqueurs de viabilité sont des substrats qui présentent un intérêt pour évaluer l'efficacité d'un désinfectant puisqu'ils deviennent fluorescents lorsqu'ils sont métabolisés par les bactéries viables uniquement. On peut citer notamment le CTC (chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tétrazolium), le XTT (hydroxyde de 2,3-bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-5-[(phénylamino)carbonyl]-2H-tétrazolium), la résazurine ou la FDA (diacétate de fluorescéine). La fluorescence libérée est théoriquement proportionnelle au nombre de cellules viables, seules capables de métaboliser ces marqueurs. Peeters *et al.* (2008) ont comparé les signaux obtenus après marquage par la résazurine, XTT et la FDA

de suspensions de *P. aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *S. aureus* et *Propionibacterium acnes*. Leurs résultats indiquent que les limites basses de quantification pour les marqueurs fluorescents varient entre 10^5 et 10^6 UFC/puits. Les biofilms formés dans les conditions de la présente étude étant constitués d'environ 10^7 UFC/puits, ces techniques ne permettraient de détecter, dans le cas de notre étude, que des RL de 1 ou 2 log.

Ainsi, les variations de quantité de cellules dans le biofilm peuvent parfois être mal perçues. Ce problème est à nouveau illustré par les résultats obtenus par Pitts *et al.* (2003), qui ont comparé la quantification sur gélose de cellules de biofilms de *P. aeruginosa* (PAO1) de 24 h formés en milieu TSB et exposés à des chocs chlorés (de 1 à 1000 ppm). Bien que les auteurs considèrent la méthode CTC efficace pour discriminer l'efficacité de différentes concentrations en chlore (de 1 à 1000 ppm), on peut constater qu'à faible concentration (1 ppm), les résultats montrent une très forte variabilité (réduction du pourcentage de marquage variant de 20 à 60 % selon les essais). Or les résultats obtenus par les auteurs par quantification sur gélose indiquent sans ambiguïté que cette concentration n'est pas efficace (RL ≈ 0 pour tous les essais). Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse aboutissent à des résultats similaires (voir Figure IV-5) : un choc chloré de 1 h à 1 ppm permet d'observer une RL proche de 0.

Pour conclure, les méthodes de quantification des bactéries du biofilm par culture sur boîtes sont souvent remises en cause étant donné qu'elles ne prennent en compte qu'une partie des bactéries constituant le biofilm et ne permettent pas la quantification des bactéries en état de dormance, ou sous forme VBNC. Toutefois, l'objectif de cette étude était de mesurer la bactéricidie et donc de comparer le nombre de bactéries potentiellement infectieuses (dont les bactéries cultivables) avant et après traitement. La méthode de quantification par culture a une meilleure sensibilité et permet donc de détecter des variations faibles (traitement peu efficace) et des différences d'efficacité entre traitements (variation du temps de contact ou de concentration, voir Figure IV-5, Figure IV-6, Figure IV-7). Les résultats de désinfection par des traitements chlorés, obtenus par Pitts *et al.* (2003) sur biofilms de *P. aeruginosa* exposés au chlore et quantifiés par culture sur gélose sont, en outre, similaires à ceux obtenus dans cette étude pour des concentrations de 1 et 10 ppm : à 1 ppm, aucune réduction du nombre de bactéries du biofilm n'a été observée, alors qu'à 10 ppm, la réduction peut atteindre 2 log mais varie en fonction des essais. L'ensemble de ces résultats indiquent une bonne

reproductibilité de la méthode d'évaluation de la bactéricidie sur biofilms de *P. aeruginosa* par numération des UFC, et une meilleure sensibilité de cette méthode par rapport aux objectifs fixés.

IV.5.2 *Évaluation des traitements biocides*

De manière générale, la méthode de mesure de l'activité bactéricide selon la norme NF EN 1040 a démontré que les traitements chimiques étaient efficaces aux concentrations préconisées par les fabricants pour des temps de contact de 1 heure. Toutefois, il apparaît clairement que ces mêmes traitements ne sont plus efficaces dès lors que *P. aeruginosa* forme un biofilm. Cette diminution d'activité est particulièrement visible pour les traitements par le chlore et par le PHMB.

IV.5.2.1 *Hypochlorite de sodium*

L'hypochlorite de sodium (NaClO) a été utilisé dans cette étude pour la réalisation des traitements chlorés, étant le désinfectant chimique le plus répandu (désinfection des eaux potables, de piscines, industries agro-alimentaires, établissements hospitaliers, désinfection de surfaces, etc.) particulièrement dans le domaine de l'eau. Des solutions diluées d'hypochlorites sont également utilisées pour l'antisepsie, comme la liqueur de Labarraque, ou l'eau de Dakin.

En solution, l'hypochlorite de sodium se dissocie selon l'équation suivante :



L'acide hypochloreux formé (HClO) se dissocie également pour former l'ion hypochlorite (ClO⁻) selon l'équation :



Cette réaction dépend fortement du pH : à pH = 5, l'ionisation de l'acide hypochloreux augmente et devient maximale à pH = 9. Au contraire, aux valeurs de pH < 4, le chlore dissous est prédominant :



L'ensemble HClO, ClO⁻ et Cl₂ forme le chlore actif.

Malgré son utilisation répandue, les mécanismes d'action du chlore actif sont encore mal compris et plusieurs cibles sont proposées pour expliquer son activité antibactérienne (Maillard, 2002) :

- réaction avec les protéines : l'acide hypochloreux a la capacité d'oxyder les fonctions sulfhydryle des protéines pour former des ponts di-sulfures (Knox *et al.*, 1948). Les groupements aminés réagissent aussi avec l'acide hypochloreux pour former des chloramines (McKenna *et al.*, 1988). Plus récemment, Winter *et al.* (2008) ont démontré que l'acide hypochloreux provoquait un « dépliage » oxydatif des protéines thermolabiles conduisant à leur agrégation ;
- réaction avec les nucléotides : *in vitro*, l'acide hypochloreux a la capacité de réagir avec les groupements –NH (Prutz, 1998) des hétérocycles, ce qui aurait pour conséquence l'altération de l'appariement des bases ;
- réactions avec les lipides : Arnhold *et al.* (1995) ont démontré que l'acide hypochloreux réagissait avec les doubles liaisons des phospholipides insaturés et des acides gras, formant des chlorhydrines.

Ainsi, de multiples processus du métabolisme bactérien sont touchés par l'action du chlore actif et un processus particulier responsable de la mort cellulaire peut difficilement être identifié. La littérature décrit en premier lieu la fuite d'éléments cytosoliques de faibles poids moléculaires d'abord (potassium, acides aminés...), puis plus élevés (protéines, acides nucléiques), qui traduit l'augmentation de perméabilité membranaire. L'inhibition de l'oxydation du glucose a également été démontrée et serait la conséquence de l'inactivation d'enzymes sulfhydryles (Samrakandi, 1996).

Dans cette étude, une perte de sensibilité importante des bactéries sous forme de biofilm a été notée vis-à-vis du chlore. Par exemple, pour un traitement d'une heure à 50 ppm (plus forte

concentration testée), la RL est supérieure à 7 log sur cellules planctoniques alors qu'elle est de $2,27 \pm 0,28$ log sur biofilm. Ces résultats peuvent être expliqués par plusieurs phénomènes :

- Comme la majorité des biocides, le chlore peut pénétrer à l'intérieur du biofilm via les canaux aqueux, mais pas à l'intérieur des microcolonies, ce qui limite son efficacité (Mah *et al.*, 2001; Pitts *et al.*, 2003; Liaqat *et al.*, 2008). Ce phénomène a notamment été observé sur des biofilms à *E. coli* par Ryu *et al.* (2005) qui ont également démontré que la présence d'EPS et la production de curli était associées à une augmentation de la tolérance au chlore. Récemment, Cooper *et al.* (2009) ont également décrit, chez *L. pneumophila*, un phénomène de tolérance au chlore. Les auteurs ont constaté que, au sein de biofilms monoespèces formés en milieu riche et exposés à des concentrations de 10 à 90 ppm de chlore, certaines cellules étaient toujours capables de se multiplier.

L'hypochlorite de sodium a également la capacité de réagir avec les composés organiques en suspension, ce qui limite son efficacité dans les eaux fortement chargées en carbone organique dissous : plus la concentration en carbone organique dissous est importante, plus la « demande en chlore » d'une eau augmente. Ce phénomène a été illustré par Virto *et al.* (2005) qui ont montré que des populations de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia enterocolitica* et *E. coli* exposées à un traitement chloré résistaient à de plus fortes concentrations en présence de matières organiques (milieu TSB à 150 ppm). Dans le cas de biofilms, de nombreux EPS entourent les cellules bactériennes. De Beer *et al.* (1994) ont mesuré, à l'aide d'une microélectrode, la pénétration du chlore à l'intérieur d'un biofilm constitué de *P. aeruginosa* et de *Klebsiella pneumoniae*. La pénétration du chlore est lente et la vitesse de pénétration est proportionnelle à la concentration à l'extérieur du biofilm. D'après les auteurs, ce phénomène indique que le processus de diffusion a bien lieu, mais que la matrice d'EPS réagit avec le chlore et le neutralise, empêchant sa pénétration dans les couches plus profondes du biofilm. Ces données sont appuyées par les résultats obtenus par Campanac *et al.* (2002) sur biofilms de *P. aeruginosa* (souche CIP A22) formés en bouillon biofilm (BB) et en système dynamique. Les auteurs montrent que les biofilms formés sont moins sensibles que les bactéries planctoniques vis-à-vis de plusieurs ammonium quaternaires. Toutefois, après déstructuration du biofilm et lavage des bactéries permettant l'élimination des polysaccharides de la matrice, la sensibilité des cellules est quasi-complètement récupérée. L'ensemble de ces résultats démontre l'importance du matériel extracellulaire dans la diminution de la sensibilité des biofilms de *P. aeruginosa*

aux biocides et au chlore en particulier.

- Récemment, Kim et al. (2009) ont mis en évidence le fait que les différentes populations d'un biofilms de *P. aeruginosa* souche PAO1 (cellules dormantes et cellules actives) ont des sensibilités différentes au chlore. En séparant les deux types de cellules par cytométrie en flux, les auteurs ont constaté que les cellules dormantes étaient plus sensibles au chlore (à 0,2 et 0,5 ppm) que les cellules actives. Dans ce cas, la présence d'EPS n'est pas à l'origine de la résistance des cellules, le protocole utilisé pour désagréger le biofilm, avant exposition au chlore, permettant l'élimination des EPS. Les auteurs expliquent cette résistance par le fait que les cellules dormantes, plus petites, accumulent moins de composants intracellulaires susceptibles de réagir avec des oxydants, dont le chlore, que les cellules actives. Les cellules dormantes seraient donc inactivées plus rapidement par le chlore. L'étude menée par Bernay *et al.* (2006) corrobore ces résultats. Cette étude ne concerne pas des biofilms mais des populations planctoniques d'*E. coli* ayant des taux de croissance différents. Généralement, les auteurs ont pu constater que les cellules à croissance rapide sont plus sensibles aux stress (élévation de la température à 48 °C, exposition aux UVA) que les cellules se multipliant lentement. Les populations bactériennes au sein des biofilms étant hétérogènes et constituées de cellules dans des états physiologiques variés, on peut vraisemblablement envisager cette cause comme échec des traitements chlorés.

Selon la réglementation du 19 juin 2000 (Santé, 2000), le chlore peut être utilisé à des fins de désinfection dans des réseaux d'EMN à des doses allant de 10 à 100 voire 150 ppm. Même si les tests présentés dans cette étude ne concernent que des concentrations de 1 et 50 ppm, il apparaît que ces traitements ne sont pas adaptés pour l'élimination du biofilm. Ainsi, ces résultats montrent la pertinence d'études préliminaires *in vitro* sur biofilms. Toutefois, de multiples facteurs peuvent diminuer l'efficacité des traitements dans les réseaux d'EMN et par conséquent, ces travaux doivent être poursuivis par des essais *in situ* sur réseau-pilote.

IV.5.2.2 PHMB

Les résultats obtenus *in vitro* et concernant le PHMB font également apparaître une forte diminution de l'activité bactéricide sur biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 (pour la

concentration 250 ppm, RL > 7 sur cellules planctoniques et RL \approx 2 sur biofilms). Le PHMB est pourtant apprécié pour son large spectre d'activité et est considéré comme un des biocides cationiques les plus actifs. Sa synthèse conduit en réalité à la production d'oligomères de biguanides de poids moléculaires variant entre 500 et 6000, les longues chaînes possédant une meilleure activité antibactérienne. La difficulté à uniformiser les mélanges de PHMB a, à l'époque de la découverte de sa synthèse, exclu son usage pharmaceutique. Néanmoins, il a rapidement été utilisé en tant que biocide (Gilbert *et al.*, 2005), notamment pour la désinfection des piscines (Baquacil ®, Révacil ®).

Le PHMB se lie rapidement aux enveloppes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Il conduit notamment au pontage des phospholipides adjacents au sein de la membrane cellulaire. Cette activité se concentre surtout autour des protéines et conduit à la perte de leurs fonctions, donc à la réduction des transports transmembranaires, de la biosynthèse et des activités cataboliques. Des fuites de composants cellulaires sont aussi observées, notamment de cations tels que le potassium (Gilbert *et al.*, 2005).

À l'heure actuelle, le PHMB est utilisé pour son activité protozoairicide dans le traitement de kératites amibiennes (à *Acanthameoba*) (Marciano-Cabral *et al.*, 2003) ou dans les liquides de nettoyage de lentilles de contact (Santodomingo-Rubido, 2007). Récemment, son activité virucide contre le VIH (souche VIH-1) a été démontrée (Krebs *et al.*, 2005). Sa faible toxicité conduit parfois à l'utiliser en tant qu'antiseptique (Muller *et al.*, 2008).

Peu de données sont disponibles dans la littérature à propos de l'efficacité du PHMB sur biofilms. Gilbert *et al.* (2001) ont comparé les concentrations de biocides nécessaires pour éliminer 95 % de populations planctoniques et de biofilms d'*E. coli* ou de *S. epidermidis* en 30 min. Dans le cas du PHMB, les auteurs concluent que les concentrations actives sur bactéries planctoniques sont 2,4 fois moins (*E. coli*) à 33 fois moins (*S. epidermidis*) actives sur biofilms. Récemment, Moore *et al.* (2008) ont étudié des biofilms constitués d'un microcosme typique de canalisations domestiques d'évacuation d'eaux usées. Ces biofilms ont été exposés pendant 6 mois à de faibles concentrations en PHMB (0,1 à 0,4 ppm). Les auteurs ont constaté, pendant la durée du traitement, une diminution des cocci à Gram positif et une augmentation des *Pseudomonadacea* cultivables au sein du biofilm. Par ailleurs, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) du PHMB, de la

chlorhexidine et de deux ammonium quaternaires vis-à-vis de nombreuses espèces exposées (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Ralstonia sp.*, *S. capitis*, *S. heamolyticus*...) sont augmentées (même si la rémanence de ces tolérances n'a pas été étudiée). Ces résultats démontrent que le PHMB a une efficacité réduite sur les biofilms et peut conduire, dans le cas de doses sublétales, à des augmentations de la tolérance bactérienne.

La diminution de sensibilité des biofilms vis-à-vis du PHMB n'est pas élucidée à ce jour, mais quelques mécanismes peuvent être proposés :

- En tant que molécules chargées positivement, on peut supposer que, comme dans le cas du chlore, le PHMB est inhibé par la présence des polysaccharides extracellulaires de la matrice chargés négativement (alginates chez *P. aeruginosa* par exemple). Hope *et al.* (2004) ont par exemple observé que la vitesse de pénétration de la chlorhexidine dans un biofilm multi-espèces, similaire à la plaque dentaire, était ralentie. Compte tenu de la faible taille de cette molécule, les auteurs excluent une inhibition de la diffusion par « tamisage moléculaire » à travers la matrice d'EPS et sont en faveur d'interactions ioniques ralentissant la diffusion.
- Comme évoqué précédemment, la pénétration de molécules peut également être diminuée par le réseau formé par la matrice autour des cellules du biofilm. Au sein de ce réseau, les molécules de grandes tailles pénètrent moins bien que les molécules de petite taille, phénomène démontré par Bryers *et al.* (1998). Le PHMB étant constitué de molécules de haut poids moléculaire (de 500 à 6000), il se pourrait donc que le manque d'efficacité sur biofilms provienne d'un défaut de pénétration par tamisage.
- L'activité du PHMB est essentiellement dirigée sur la membrane externe bactérienne. Des altérations de la composition lipidique de la membrane externe peuvent conduire à la diminution de l'efficacité du PHMB sur les cellules. Ce phénomène a notamment été identifié par Broxton *et al.* (1984) par l'étude de la sensibilité du PHMB sur des cultures de *E. coli* issues d'un milieu carencé en phosphore ou non. Les cellules issues d'un milieu carencé possèdent moins de la moitié de la quantité de phospholipides que les cellules issues d'un milieu non carencé en phosphore et sont plus résistantes vis-à-vis du PHMB.

Le test en microplaque utilisé pour analyser l'impact de la forme biofilm sur l'efficacité de traitements biocides s'est donc révélé également utile dans l'étude du PHMB. À la suite de nos résultats, on pouvait s'attendre à une mauvaise efficacité du traitement en réseau-pilote. En effet, les analyses ont montré qu'un traitement par le PHMB permet d'éliminer temporairement une contamination par *P. aeruginosa* (aucune bactérie cultivable n'ayant été détectée suite au traitement). Par contre, 4 jours après l'épisode de désinfection, la bactérie est à nouveau détectée au niveau de 3 points de prélèvements. Même si la cause de cette recontamination ne peut pas être déterminée à ce jour, on peut envisager la formation d'un biofilm dans les canalisations du réseau, n'ayant pas été affecté par la désinfection et à l'origine du relargage de bactéries dans l'EMN. Toutefois, d'autres paramètres peuvent influencer sur l'efficacité d'un traitement *in situ*, comme en témoignent les résultats concernant l'étude du choc thermique (voir IV.5.2.4).

IV.5.2.3 Sanosil ®

Le Sanosil ® est un produit désinfectant communément utilisé pour la désinfection des réseaux d'EMN. Sa formulation combine 2 composés : un oxydant, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 50 %) et des agents stabilisants, sous forme d'ions argent (0,05 %). Bien que ce produit soit privilégié par de nombreux établissements pour la désinfection des réseaux d'eau, les données concernant son pouvoir bactéricide, notamment sur biofilm, sont parfois partielles. Des publications concernant le peroxyde d'hydrogène seul ou les ions argent sont toutefois disponibles. Les propriétés bactéricides de ces deux agents seront d'abord discutées séparément.

En ce qui concerne le peroxyde d'hydrogène seul, la littérature émet des avis divergents. Ce produit est actuellement utilisé pour diverses applications, du fait de ses propriétés bactéricide, sporicide, fongicide et virucide. Sa faible toxicité et sa biodégradabilité sont également appréciées (Tote *et al.*, 2009). Son utilisation aboutit à la formation de radicaux hydroxyle qui oxydent les groupements thiols des protéines. Il agit également sur les ribosomes (Maillard, 2002). On reporte son utilisation pour la désinfection des tuyaux d'alimentation en eau des fauteuils dentaires, la vaporisation pour la désinfection des surfaces en milieu hospitalier (Orlando *et al.*, 2008), la désinfection d'instruments chirurgicaux ou

pour empêcher la colonisation bactérienne d'implants ou de cathéters. Récemment, Glynn *et al.* (2009) ont démontré que des concentrations sublétales d' H_2O_2 permettaient d'empêcher l'accumulation de biomasse dans un biofilm de *S. epidermidis*.

Des études récentes viennent nuancer ces résultats. Même si le peroxyde d'hydrogène a une bonne activité sur cellules planctoniques (Tote *et al.*, 2009), son activité peut être nettement diminuée sur certains biofilms bactériens (Presterl *et al.*, 2007; Peeters *et al.*, 2008). Une étude menée sur des biofilms formés dans un système équipant des fauteuils dentaires a montré que le peroxyde d'hydrogène seul permettait l'élimination de 35 à 67 % des cellules viables du biofilm sans toutefois aboutir à une élimination complète (Liaqat *et al.*, 2008). Les données de la littérature concernant la bactérie *P. aeruginosa* montrent une tolérance de la bactérie au peroxyde d'hydrogène, notamment sous forme biofilm. La forme biofilm augmente intrinsèquement la résistance aux agents antimicrobiens et plusieurs facteurs expliquant ces résistances (diminution de la diffusion de molécules à l'intérieur de la matrice, sous-populations de cellulaires moins sensibles aux biocides) ont déjà été décrits dans les paragraphes IV.5.2.1 et IV.5.2.2. Il faut rajouter ici l'expression de plusieurs catalases (KatA et KatB notamment) par *P. aeruginosa*. Des cellules en suspension (souche PAO1) peuvent en effet résister à 50 mM d' H_2O_2 pendant 20 min. Les biofilms de cette souche sont également peu affectés par un traitement de 1 h à 50 mM (Elkins *et al.*, 1999). Stewart *et al.* (2000) ont en effet montré que la catalase KatA limitait la pénétration du peroxyde d'hydrogène dans le biofilm de PAO1 et participait majoritairement à la résistance des cellules. Complétant ces travaux, Cochran *et al.* (2000) ont démontré que des cellules de PAO1 adhérentes (mais ne formant pas de biofilm structuré) sont moins sensibles au peroxyde d'hydrogène, probablement du fait de l'induction de l'expression de certains gènes lorsque la bactérie adhère à une surface.

Parallèlement, Kim *et al.* (2009) ont montré que les cellules actives ou dormantes d'un biofilm de *P. aeruginosa* (PAO1) ont la même sensibilité vis-à-vis d' H_2O_2 . Dans le cas d'un biofilm à *P. aeruginosa*, la diminution de sensibilité à H_2O_2 ne paraît donc pas liée à la présence de différentes sous-populations cellulaires dans le biofilm.

Devant la faible activité bactéricide du peroxyde d'hydrogène seul sur biofilms de *P.*

aeruginosa, des formulations faisant intervenir plusieurs composants ont été développées. DeQuieroz *et al.* (2007) ont par exemple décrit l'utilisation d'hypochlorite de sodium combiné au peroxyde d'hydrogène pour inactiver et éliminer les cellules de biofilms de *P. aeruginosa*. D'autres formulations associent le peroxyde d'hydrogène à de l'acide peracétique (Bauermeister *et al.*, 2008).

Dans la présente étude, le peroxyde d'hydrogène a été utilisé en combinaison avec l'argent. Les ions argents contenus dans le Sanosil® ont également une activité bactéricide reconnue, même s'ils constituent, dans cette formulation, des agents de stabilisation. L'utilisation de l'argent en tant que moyen de désinfection n'est pas récente. Ses propriétés biocides sont liées à sa capacité à interagir avec les groupements thiols des protéines et à rompre les liaisons hydrogène. Ainsi ils ralentissent l'absorption de nutriments, inhibent la division cellulaire, interfèrent avec le transfert de protons et se lient à l'ADN. La présence d'ions Ag^{++} dans l'eau permet d'inactiver des suspensions de micro-organismes contaminant l'eau, dont *P. aeruginosa* (Hwang *et al.*, 2007). Des systèmes d'ionisation cuivre-argent sont utilisés pour empêcher la prolifération de *L. pneumophila* dans l'eau potable (Liu *et al.*, 1998). Des peintures comportant de l'argent permettent également de limiter la colonisation de surfaces par les micro-organismes (Rogers *et al.*, 1995). Étant donné que les ions argent sont hautement réactifs et ont la capacité de se lier aux molécules biologiques, ils peuvent également perturber l'organisation de la matrice extracellulaire du biofilm (liaisons aux polysaccharides et aux protéines). L'étude menée par Chaw *et al.* (2005) suggère que les ions argent se fixent sur les groupements donneurs d'électrons, réduisant ainsi le nombre de sites disponibles pour les liaisons hydrogène et les interactions électrostatiques et hydrophobes. Cette propriété pourrait indiquer une inhibition de l'adhésion voire une action déstructurante de la matrice de polysaccharide conduisant à la désorganisation du biofilm.

Dans cette étude, l'association H_2O_2 et Ag^{++} a mené à de meilleurs résultats sur biofilms que le chlore et le PHMB. Même si les concentrations utilisées (1000 ppm préconisés) sont nettement supérieures à celles utilisées pour le chlore (10 à 150 ppm préconisés) et le PHMB (20 à 40 ppm préconisés), on a pu remarquer une meilleure activité du Sanosil® sur biofilms par rapport aux autres traitements chimiques. Par exemple, la RL obtenue pour un traitement équivalent à 500 ppm d' H_2O_2 pendant 1 h est de $4,04 \pm 0,38$ log sur cellules planctoniques et

de $3,39 \pm 0,16$ log sur biofilms (différence d'efficacité de 0,65 log environ). En comparaison, la RL obtenue pour un traitement de 1 ppm de chlore pendant 1 h est de $3,85 \pm 0,14$ log sur cellules planctoniques et de $0,20 \pm 0,16$ log sur biofilms (différence d'efficacité de 3,65 log environ). Une étude récente de Toté *et al.* (2009) corrobore ces résultats. Les auteurs ont montré que la combinaison peroxyde d'hydrogène et ions argent permet d'obtenir des niveaux de désinfection supérieurs à la désinfection par le peroxyde d'hydrogène seul (sur *S. aureus*, *E. coli*, *Candida albicans* et spores de *Bacillus subtilis*). Un comparatif de différents biocides sur des biofilms colonisant des systèmes hydriques de fauteuils de soins dentaires a permis de démontrer que le Sanosil® (5 %) éliminait efficacement le biofilm de la surface testée : après traitement, les auteurs n'ont pu détecter aucune bactérie viable et les analyses microscopiques ont montré une diminution supérieure à 95 % de la surface couverte par le biofilm (Walker *et al.*, 2003). Ainsi, on peut conclure à un effet synergique de l'association H₂O₂ et ions argent qui pourrait expliquer les résultats obtenus dans la présente étude, à savoir des RL supérieures à celles obtenues par des traitements chlorés ou par PHMB sur biofilms. Cet effet pourrait également être attribué au rôle stabilisateur des ions argent qui pourrait permettre au peroxyde d'hydrogène d'avoir une activité plus durable (dégradation retardée).

IV.5.2.4 Choc thermique

Le choc thermique, parfois appelé pasteurisation, est une technique très répandue pour la désinfection des réseaux d'eau et dans de nombreuses industries agroalimentaires. Dans le domaine de l'eau, son utilisation est préconisée pour l'élimination de *L. pneumophila* dès lors que la température atteint 60 °C pendant au moins 30 min (Muraca *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 2002). Des chocs thermiques réguliers sont recommandés pour la désinfection des appareils d'hémodialyse (Cappelli *et al.*, 2006).

La résistance à différents stress, dont un stress thermique a été décrite par Jørgensen *et al.* (1999) chez *P. aeruginosa* (PAO1). L'étude montre que le facteur σ RpoS permet à cette souche de résister à un choc thermique de 53 °C pendant 25 min (RL = $0,44 \pm 0,04$ log) alors qu'une souche mutée pour ce facteur subit une RL = $2,2 \pm 0,36$ log. Toutefois, la sensibilité de plusieurs bactéries susceptibles de contaminer l'eau a été établie par Spinks *et al.* (2006). Dans cette étude, les auteurs montrent que des suspensions de *P. aeruginosa* ne présentent pas de résistance à la chaleur au-delà de 55 °C et que quelques secondes suffisent à inactiver une

suspension de *P. aeruginosa* à 65 °C.

Les résultats obtenus *in vitro* au cours de ces travaux de thèse confirment que, quel que soit le statut de la bactérie (planctonique ou adhérente), la sensibilité à un choc thermique de 80 °C pendant 60 min est maximale (supérieure à 6 log). Aucune bactérie cultivable n'a été détectée, par culture, après les chocs effectués, ce qui permet d'affirmer que les traitements permettent une bonne désinfection des biofilms.

Toutefois, en réseau-pilote, même si immédiatement après le choc effectué aucune cellule de *P. aeruginosa* n'a été détectée dans le réseau, quatre points de prélèvements présentent une contamination à *P. aeruginosa* 7 jours après l'épisode de désinfection. De tels épisodes de recolonisation ont déjà été décrits suite à des chocs thermiques, notamment sur des unités d'hémodialyse (Cappelli *et al.*, 2003). Dans cette étude, les auteurs concluent à une efficacité limitée des chocs thermiques (85 °C pendant 15 min) en tant que moyen de désinfection. L'association de traitements de désinfection avec un détartrage à l'acide citrique (12 %) permet toutefois une meilleure désinfection et une recolonisation plus lente du réseau utilisé pour l'étude, ce qui démontre l'effet protecteur de dépôts minéraux pour les micro-organismes. L'eau minérale naturelle utilisée dans le réseau-pilote étant fortement chargée en calcaire et magnésium, il est possible que la formation de tartre ait réduit l'efficacité du choc thermique.

Les bras morts d'un système de canalisations d'eau représentent des zones de faibles débits, voir de stagnation, et dans lesquels la formation du biofilm peut être favorisée et où les concentrations en biocides nécessaires pour une bonne désinfection ne sont souvent pas atteintes. Le réseau-pilote utilisé pour les essais a été conçu de manière à éviter les bras morts. Cependant, certains équipements (robinets de prélèvement et de vidange, manomètres) peuvent présenter des zones où l'eau circule moins bien et qui ont donc pu héberger des micro-organismes, expliquant l'efficacité partielle des traitements et les phénomènes de recolonisation.

IV.6 Conclusion

Les essais de désinfection menés *in vitro* ont permis de vérifier, dans un premier temps, les conditions d'utilisation (concentrations et temps de contact) des biocides préconisées pour la désinfection des réseaux d'EMN, sur cellules planctoniques de *P. aeruginosa* (PAO1). La suite de ces essais, menés cette fois sur biofilms, a permis de constater que ces conditions n'étaient pas toujours actives sur biofilms, en particulier les traitements chimiques (chlore, Sanosil ® et PHMB). Ces résultats illustrent l'importance d'évaluer les traitements de désinfection sur biofilms et non plus seulement sur cellules planctoniques, comme le recommandent les normes actuelles.

Dans un second temps, les travaux de cette thèse ont consisté à évaluer certains traitements (choc thermique et PHMB) sur une contamination par la bactérie *P. aeruginosa* au sein d'un réseau-pilote alimenté en EMN. Une activité bactéricide partielle (RL < 5 log) ayant été démontrée sur biofilms pour le PHMB, des résultats mitigés étaient attendus sur réseau-pilote. Toutefois, le choc thermique, qui avait permis d'atteindre de bons niveaux de bactéricidie *in vitro*, tant sur cellules planctoniques que sur biofilms, a seulement conduit à une élimination temporaire d'une contamination par *P. aeruginosa*. Sept jours après le traitement, la bactérie était à nouveau détectée dans le réseau.

L'ensemble de ces travaux indique que :

- l'évaluation des pouvoirs bactéricides des traitements *in vitro*, par le modèle de formation de biofilms statique en microplaques, présente un intérêt certain, puisqu'il permet l'étude de biofilms qui se rapprochent de ceux formés en réseau d'eau et de mettre en évidence des différences de sensibilité entre différents traitements ;
- l'association de plusieurs méthodes pour la détermination de l'efficacité de traitements de désinfection permet d'avoir une meilleure représentation des paramètres qui peuvent nuire à l'efficacité des chocs biocides. Même si la technique de mesure de la bactéricidie en microplaques a permis une bonne discrimination de l'efficacité de la plupart des traitements, les essais menés *in situ* sur un réseau-pilote ont apporté une nuance à certains résultats. Des paramètres tels que la présence de tartre ou de zones où les débits sont

faibles peuvent aussi se répercuter sur l'efficacité des traitements.

Il est également à noter que la méthode de quantification bactérienne utilisée lors des essais *in situ* permet de détecter uniquement des bactéries cultivables (donc viables) dans 250 mL d'EMN en circulation, et non des cellules adhérees, sous forme de VBNC ou présentes en quantités inférieures à la limite de détection. D'autre part, lors des traitements, la mesure de la concentration en biocides résiduelle n'a pas été vérifiée, or certains désinfectants, comme le chlore, peuvent être rapidement inactivés. Le maintien de la concentration efficace pendant toute la durée du traitement permet de se prémunir d'échecs de désinfection. De nouveaux essais, prenant en compte ces remarques pourraient donc être réalisés sur le réseau-pilote.

CHAPITRE V

*Rôle des biofilms dans la
résistance de *L. pneumophila*
au choc thermique*

V.1 Introduction

L. pneumophila colonise des environnements artificiels caractérisés par la production d'aérosols (pommeaux de douches, robinets, fontaines, spas, systèmes de climatisation, tours aérorefrigérantes), à l'origine du risque infectieux. De nombreux paramètres favorisent la présence *L. pneumophila* dans l'eau : la dureté, la température (25 à 45 °C), la corrosion, le tartre, les faibles débits, la présence d'amibes et la formation de biofilm (Murga *et al.*, 2001). On sait que le biofilm représente une niche de colonisation de choix pour *L. pneumophila* puisqu'il lui permet de résister à de nombreux stress : UV, antimicrobiens de type biocides (Kim *et al.*, 2002; Borella *et al.*, 2005). Toutefois, à l'heure actuelle, la capacité de *L. pneumophila* à adhérer aux surfaces et à former des biofilms n'est pas clairement élucidée.

Des études antérieures montrent que *L. pneumophila* peut coloniser des biofilms formés en conditions oligotrophes constitués d'espèces bactériennes caractéristiques de ces milieux (Rogers *et al.*, 1992; Rogers *et al.*, 1994). Pour la majorité des auteurs, les protozoaires sont indispensables à la multiplication de *L. pneumophila* au sein de biofilms (Kuiper *et al.*, 2004; Declerck *et al.*, 2007), toutefois, il a été montré que certaines espèces bactériennes (*Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*) favorisent la croissance des légionelles.

De nouveaux modèles en milieu riche (BYE) sont aujourd'hui utilisés pour l'étude des formes sessiles de *L. pneumophila*. Toutefois, Mampel *et al.* (2006) ont montré que ce sont les bactéries planctoniques qui se multiplient et adhèrent à la surface ultérieurement.

Au final, aucun modèle de formation de biofilm en milieu nutritif réduit et dans lequel n'interviendrait aucune espèce amibienne ou bactérienne n'est actuellement décrit. Or la structure d'un biofilm formé dans de telles conditions pourrait différer nettement d'un biofilm formé en milieu riche. Le caractère mono-microbien du biofilm ainsi formé pourrait permettre d'améliorer la compréhension de la physiologie de *L. pneumophila* adhérente, sans biais lié à la présence d'autres espèces.

Le but de cette étude est, dans un premier temps, de rechercher des conditions de culture permettant à *L. pneumophila* de croître de manière sessile en l'absence d'autres micro-organismes (eucaryotes ou procaryotes), afin de disposer d'un protocole d'évaluation de procédés de désinfection sur biofilms de *L. pneumophila*. Dans un second temps, le protocole

établi a été précisé par l'étude de la température optimale de croissance du biofilm et la caractérisation du biofilm a été amorcée (étude de la matrice).

Le protocole ainsi défini a permis, au final, l'évaluation de l'activité bactéricide d'un choc thermique à 80 °C sur un biofilm à *L. pneumophila*. Ces essais ont été étendus à des essais en réseau-pilote contaminé par *L. pneumophila*.

V.2 Mise au point d'un modèle de formation de biofilm monoespèce à *L. pneumophila* en microplaques

V.2.1 Mise au point et validation du modèle de base

La mise au point de ce modèle de formation de biofilm à *L. pneumophila*, par croissance des bactéries adhérees, fait l'objet d'une publication parue dans le journal « Biofouling » (Pécastaings *et al.*, 2010), résumée ci-dessous.

L'intérêt de ces travaux était de mettre au point un milieu de culture spécifique de *L. pneumophila* dans lequel la croissance bactérienne ne s'opère pas de manière planctonique, contrairement au milieu riche BYE, mais sous forme sessile. D'autre part, la coculture avec d'autres micro-organismes eucaryotes (amibes) ou procaryotes (autres espèces bactériennes pouvant avoir un rôle symbiotique) a été évitée.

La première partie des résultats de l'article rapporte la sélection du milieu de culture. Neuf milieux ont été testés dans un modèle de culture en microplaque incubée à 37 °C, avec renouvellement de milieu tous les 3 jours, à partir d'un inoculum de 10⁶ UFC/mL :

- Des milieux oligotrophes, d'une part, notamment de l'eau distillée stérile, de l'EAP stérile ou non, de l'EMN stérile. Ces milieux ont pu être supplémentés en fer et cystéine (supplément *Legionella* normalement concentré, bioMérieux).
- Des bouillons synthétiques ou semi-synthétiques. Le Laboratoire de Microbiologie Industrielle disposait déjà d'un milieu adapté à la croissance de biofilms mono-espèces de *P. aeruginosa* (voir III.1.3.2), de *S. aureus*, ou de *B. subtilis* : le milieu Bouillon Biofilm classique (BB). L'apport carboné de ce milieu peut provenir d'acides aminés (sous forme

d'extrait de levure et d'acides casaminés, BB) ou bien de glucose (milieu Bouillon Biofilm Modifié (MBB)). Dans tous les cas, les concentrations en nutriments sont fortement réduites par rapport à un milieu de culture classique, afin de favoriser l'adhésion des micro-organismes. Ces milieux ont été utilisés avec une supplémentation en fer et cystéine (supplément *Legionella* dilué 10 fois, bioMérieux – milieu SBB et SMBB).

Les biofilms d'une souche de référence (CIP 103854) et d'une souche environnementale (HW S2-14) ont été visualisés par microscopie confocale et comparés à des biofilms formés dans les différents milieux. Les résultats font apparaître que seuls les milieux SBB et BYE permettent l'adhésion de bactéries et la formation d'agrégats typiques d'une structure biofilm après 6 j d'incubation. Les agrégats formés en BYE ne dépassent toutefois pas 64 µm de hauteur tandis que les agrégats formés en SBB peuvent atteindre 300 µm.

La seconde partie de l'article consiste à caractériser l'origine de la croissance bactérienne dans le milieu SBB. Le mode de croissance dans le milieu SBB a été démontré en inoculant une faible quantité de bactérie (10^2 UFC/mL) puis en suivant les quantités de bactéries dans le biofilm (par grattage des puits) et en suspension (par prélèvement direct du milieu de culture) au cours du temps, pendant 12 jours. Les résultats montrent que le nombre de bactéries du biofilm augmente en même temps (environ 6 log UFC/cm² après 12 j) que la quantité de bactéries planctoniques (environ 7 log UFC/mL). Ainsi, la croissance bactérienne a bien lieu, mais cette expérience ne permet pas de déterminer si ce sont les bactéries du biofilm ou les bactéries planctoniques qui se multiplient. Pour répondre à cette question, des suspensions bactériennes ont été préparées en milieu SBB et BYE et mises sous agitation à 37 °C. La densité optique, témoin de la croissance planctonique, a été suivie pendant 72 h (temps entre 2 renouvellements de milieu dans les microplaques). L'expérience montre qu'aucune croissance planctonique ne se produit en milieu SBB, contrairement au milieu BYE. L'ensemble de ces résultats suggère que, en milieu SBB, la croissance des bactéries est à l'origine de la formation du biofilm.

En dernier lieu, ce protocole de formation de biofilms a été reproduit avec 2 souches environnementales, dont une de séro groupe 1. Les résultats montrent que le biofilm en SBB se constitue quelle que soit la souche de *L. pneumophila* utilisée. Deux méthodes de

quantification ont également été comparées : la culture sur boîte et la qPCR, qui permet de quantifier le nombre d'unités génome total d'un échantillon (bactéries cultivables, viables et non cultivables, mortes, ADN extracellulaire). Les résultats sont les mêmes quelle que soit la méthode utilisée, ce qui permet de conclure que la majorité des bactéries du biofilm sont viables et cultivables. Ces résultats ont également été confirmés par des marquages de viabilité sur biofilms (kit LIVE/DEAD® BacLight™, indicateur de l'intégrité membranaire). Les observations par microscopie confocale font apparaître que la majorité des bactéries (> 90 %) sont viables.

L'ensemble de ces résultats démontre que le modèle de culture de *L. pneumophila* en microplaque et en milieu SBB permet la formation de biofilms mono-espèces au sein desquels se produit la multiplication bactérienne. Ce modèle pourra servir de base à l'étude de la physiologie de *L. pneumophila* adhérente mais aussi à l'évaluation de biocides visant à maîtriser les contaminations de réseaux d'eau.

Sessile *Legionella pneumophila* is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms

S. Pécastaings^{a,b,*}, M. Bergé^a, K.M. Dubourg^b and C. Roques^a

^aLU 49, Adhésion bactérienne et formation de biofilms, UPS; Université de Toulouse, Toulouse, France; ^bInstitut du Thermalisme, Université Victor Segalen-Bordeaux 2, Dax, France

(Received 13 April 2010; final version received 27 August 2010)

Currently, models for studying *Legionella pneumophila* biofilm formation rely on multi-species biofilms with low reproducibility or on growth in rich medium, where planktonic growth is unavoidable. The present study describes a new medium adapted to the growth of *L. pneumophila* monospecies biofilms *in vitro*. A microplate model was used to test several media. After incubation for 6 days in a specific biofilm broth not supporting planktonic growth, biofilms consisted of $5.36 \pm 0.40 \log$ (cfu cm⁻²) or $5.34 \pm 0.33 \log$ (gu cm⁻²). The adhered population remained stable for up to 3 weeks after initial inoculation. *In situ* confocal microscope observations revealed a typical biofilm structure, comprising cell clusters ranging up to $\sim 300 \mu\text{m}$ in height. This model is adapted to growing monospecies *L. pneumophila* biofilms that are structurally different from biofilms formed in a rich medium. High reproducibility and the absence of other microbial species make this model useful for studying genes involved in biofilm formation.

Keywords: *Legionella pneumophila*; biofilm; sessile growth; confocal microscopy

Introduction

The etiological agent of Legionnaire's Disease and Pontiac Fever, *Legionella pneumophila*, is a ubiquitous Gram-negative rod frequently isolated in fresh water. Ecological studies have demonstrated that environmental reservoirs for the Legionellaceae are usually freshwater aquatic systems such as lakes and rivers, as well as soil (Fliermans et al. 1981). In the environment, *Legionella pneumophila* adopts a specific life cycle, alternating between a transmissive phase and a replicative phase, that allows the bacterium to colonize and replicate in protozoa. The ability of *L. pneumophila* to replicate in eucaryotic phagocytic cells in the environment most likely accounts for its ability to infect human lung macrophages and cause a potentially lethal pneumonia (Molofsky and Swanson 2004). Because of its ubiquity, *L. pneumophila* also colonizes man-made environments such as water pipes, shower heads, faucets, fountains, spas, air-conditioning systems, and cooling towers. Inhalation of water droplets from these devices can lead to Legionnaire's disease (Bollin et al. 1985). Various parameters favor the presence of *L. pneumophila* in water, such as hardness, temperature (between 25 and 45°C), corrosion, scale, flow regimes (Lasheras et al. 2006; Liu et al. 2006), and biofilms (Murga et al. 2001). Biofilms are fixed microbial communities located at the interface between a biotic or abiotic surface and an aqueous phase

(Donlan 2002; Hall-Stoodley et al. 2004) and are considered to be the most important source of water pipe contamination (Berry et al. 2006). One of the many advantages of a biofilm to *L. pneumophila* is its increased resistance to stressful environmental conditions and to biocides (Kim et al. 2002; Borella et al. 2005).

At this time, little is known about surface colonization and biofilm formation by *L. pneumophila*. Previous studies have shown that in oligotrophic conditions *L. pneumophila* is able to colonize multi-species biofilms from water systems, (Rogers and Keevil 1992; Rogers et al. 1994). Some authors argue that other microbial species are indispensable for *L. pneumophila* to multiply in a biofilm in such conditions (Kuiper et al. 2004; Declerck et al. 2007). Hence, these models involve interactions among multiple species, making them poorly reproducible *in vitro* for subsequent analyses.

More recently, *L. pneumophila* biofilm formation was studied in a model using the rich growth medium, Buffered Yeast Extract (Piao et al. 2006; Hindre et al. 2008), to produce monospecies *L. pneumophila* biofilms. However, Mampel et al. (2006) showed that growth was mostly due to planktonic rather than sessile growth. Also, growth conditions used in these studies could have led to a different biofilm structure compared to that developed in less nutritious conditions. The aim of the present study was to design

*Corresponding author. Email: sophie@pecastaings.net
Published online 8 September 2010

conditions that promote the growth of adherent *L. pneumophila*, not simple cell adhesion, in order to produce a monospecies structured biofilm and to dispose of a more accurate model for *in vitro* purposes.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Four strains of *L. pneumophila* were used. *L. pneumophila* serogroup 1 strain Philadelphia 1 was obtained from the Collection Institut Pasteur, Paris, France (CIP 103854 corresponding to strain ATCC 33152) and was used as a reference strain. Two environmental non-serogroup 1 *L. pneumophila* strains were also used: one was isolated in a hot water system by the Laboratory of Industrial Microbiology, Toulouse, France (HW S2-14), and the other in a mineral water system, by the Institut du Thermalisme in Dax, France (NMW S2-14). The fourth strain was a serogroup 1 environmental isolate from a hot water system, recovered by the Laboratory of Bacteriology and Hygiene of the Hospital of Purpan, Toulouse, France (HW S1). Strains were stored in Eugon broth (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) plus 15% glycerol (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France), at -80°C . All strains were routinely grown on Buffered Charcoal Yeast Extract agar (BCYE, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), for 72 h at 37°C .

Before assays, bacterial suspensions were made by dispersing *L. pneumophila* colonies from a BCYE Petri dish (from frozen stock) in 10 ml of liquid medium. The optical density at 600 nm (OD_{600}) was adjusted to 0.220, in order to obtain a concentration of $\sim 10^8$ cfu ml^{-1} .

Biofilm formation was tested in various broths. Oligotrophic media consisted of sterile distilled water (SDW, sterilized at 121°C for 15 min), filter-sterilized ($0.22\ \mu\text{m}$) tap water (STW, $\text{Na}^+ = 13.0\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, $\text{K}^+ = 1.1\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, $\text{Ca}^{2+} = 34.0\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, $\text{SO}_4^{2-} = 23.0\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, $\text{Cl}^- = 12.0\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, pH 7.9), and filter-sterilized natural mineral water (NMW, $\text{Na}^+ =$

$128.9\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, $\text{K}^+ = 20.8\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, $\text{NH}_4^+ = 0.2\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, $\text{Ca}^{2+} = 127.0\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, $\text{Mg}^{2+} = 35.0\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, $\text{SO}_4^{2-} = 432.1\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, $\text{Cl}^- = 153.9\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, $\text{Fe}^{2+} = 0.08\ \text{mg}\ \text{l}^{-1}$, pH 7.4). These oligotrophic media were tested with and without an iron and cystein supplement (*Legionella* supplement, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) that was used pure (1:1) or in a tenfold dilution (1:10).

Two biofilm broths (BBs), already in use for the formation of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, or *Staphylococcus aureus* (Alasri et al. 1992; Pineau et al. 1997; Samrakandi et al. 1997; Campanac et al. 2002; Khalilzadeh et al. 2010), were tested, viz. BB and modified biofilm broth (MBB). The mineral composition of these broths is similar (Table 1), however, they differ in their carbon source. MBB contains only one carbohydrate (glucose), whereas BB contains a carbohydrate (lactose) and amino acids (yeast extract and casamino acids). Supplemented biofilm broth (SBB) and supplemented modified biofilm broth (SMBB) are derivations of BB and MBB respectively that were supplemented with iron and cystein (*Legionella* supplement, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France, 1:10 diluted). Broths were initially prepared as 10-fold concentrated solutions and then autoclaved, except for MgSO_4 , which was prepared and autoclaved separately as a 100-fold concentrated solution. The *Legionella* supplement (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) was reconstituted as recommended by the manufacturer. The solutions and the *Legionella* supplement were then appropriately diluted to obtain the final broths (see composition in Table 1).

In addition, a liquid rich medium, BYE (*N*-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES)-Buffered Yeast Extract), was used for the tests. This medium, classically used to grow *L. pneumophila* planktonically (Ristroph et al. 1980), has already been used to produce *L. pneumophila* monospecies biofilms (Mampel et al. 2006; Piao et al. 2006; Hindre et al. 2008).

Table 1. Composition of tested biofilm broths.

Composition	Concentration (mg l^{-1})	Biofilm broth (BB)	Supplemented biofilm broth (SBB)	Modified biofilm broth (MBB)	Supplemented modified biofilm broth (SMBB)
MgSO_4^a	200.0	+	+	+	+
FeSO_4^a	0.5	+	+	+	+
$\text{Na}_2\text{HPO}_4^a$	1250.0	+	+	+	+
KH_2PO_4^a	500.0	+	+	+	+
Casamino acids ^b	100.0	+	+	–	–
Lactose ^b	25.0	+	+	–	–
Yeast extract ^c	100.0	+	+	–	–
Glucose ^a	50.0	–	–	+	+
<i>Legionella</i> supplement ^d	1/10 diluted	–	+	–	+

^aSigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA; ^bDifco, Becton Dickinson, Spark, MD, USA; ^cAES, Bruz, France; ^dbioMérieux, Marcy l'Étoile, France.

Biofilm production

Bacterial suspensions of the tested strains were prepared and diluted in each tested medium in order to obtain a concentration of either 10^6 or 10^2 cfu ml⁻¹. Two milliliters of bacterial suspensions were added to the wells of 24-well polystyrene microplates (BD Falcon, San Jose, CA, USA). Microplates were incubated statically at 37°C, for 6–20 days according to assays. During the course of incubation, the medium was renewed every 3 days, after two gentle rinsings, in order to eliminate planktonic bacteria and favor sessile growth. Medium selection was made with a serogroup 1 reference strain (CIP 103854) and an environmental non-serogroup 1 strain (HW S2-14).

In-well biofilm samplings were made at least 2 h after inoculation in order to evaluate initial bacterial adhesion, and then every 3 days. Before biofilm collection, planktonic cells were sampled by pipetting directly 100 μ l in the bulk phase. After two successive rinsings with 2 ml of SDW, 1 ml of SDW was added and the well was scraped with a sterilized spatula for 1 min in order to detach biofilm cells. Cell quantification was made by culture on BCYE or quantitative PCR (q-PCR).

In order to quantify viable and culturable *L. pneumophila* (planktonic or adherent), samples were homogenized and serially diluted (10-fold dilutions), and 100 μ l of each dilution was spread on BCYE plates and incubated at 37°C for 5 days.

q-PCR was used to measure the total DNA in *L. pneumophila* biofilm samples. DNA was extracted from samples (100 μ l), according to the manufacturer's instructions (Genesystems, Bruz, France) described elsewhere (Yaradou et al. 2007). Briefly, DNA was extracted using a Genextract device (Genesystems, Bruz, France), that allows the realization of all extraction steps, and extraction reagents (Genesystems, Bruz, France), by sonication (251 watts, 40 Hz, 20 min) and heat treatment (100°C, 10 min). DNA was purified on a silica column and eluted in order to proceed to q-PCR. DNA samples were analysed in triplicate. A positive (with exogenous DNA) and a negative (without probe) controls were made for each sample. A negative control was made for each extraction batch (with SDW). Calibration curves were made with calibrated *L. pneumophila* (strain ATCC 33152) DNA (Genesystems, Bruz, France). Results are given in terms of genome units (gu).

Control of planktonic growth

Liquid cultures of *L. pneumophila* (CIP 103854 or HW S2-14), were performed in BYE (Ristroph et al. 1980) or in SBB, in a neutral glass tube. Tubes were

incubated at 37°C and 250 rpm using an orbital shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA), for 72 h. Growth was analyzed by measuring OD₆₀₀ at 2, 24, 48, and 72 h.

Confocal laser scanning microscopic (CLSM) observations

For microscopic studies, biofilms were grown as described above, in 6-well polystyrene microplates (BD Falcon, San Jose, CA, USA). Before observing biofilms, 0.5 μ l of Syto[®] 9 (Syto9, 5 mM, Molecular Probe, Invitrogen, Eugene, OR, USA) was added directly into the wells. No rinsing was performed before observation because moving planktonic cells were clearly distinguishable from fixed biofilm cells, and also because the biofilm growth medium did not create any artifacts. Syto9 is a cell-permeant nucleic acid stain that shows significant fluorescent shift when bound to nucleic acids. This dye was sometimes used with Propidium Iodide (PI, LIVE/DEAD[®] BacLight[™] kit, Invitrogen, Eugene, OR, USA), an intercalating nucleic acid dye, as a counterstain. One μ l (20 mM in DMSO) of PI was added directly into the wells when necessary. PI is membrane impermeant and stains only cells with damaged membranes or extracellular DNA (eDNA), whereas Syto9 stains damaged and intact cells and also eDNA (Stocks 2004). Cells with damaged membranes and eDNA, stained with both dyes, appear mostly red because of the fading of Syto9 by PI. However, intact cells appear green. Ohno et al. (2003) validated the use of this kit to detect *L. pneumophila* viability in water.

Observations were made with a TCS SPII confocal microscope (Leica, Heidelberg, Germany), using a 40 \times (HCX PL APO water, N.A. 0.8) water immersion lens. The 488 nm ray line of an argon laser was used to detect the emission of Syto9 fluorescence, collected in the range between 498 and 533 nm. For PI, an HeNe 543 nm laser was used and the emitted fluorescence was collected in the range between 553 and 623 nm. Samples were scanned in the xy direction with a step size of 0.7 μ m. Image stacks are represented as maximal intensity projections (using the Z-project plugin) or volumic reconstructions (using the Volume Viewer plugin), achieved with Image J, a free image analysis program from NIH (Rasband 1997–2009). Each image is representative of the results of two assays.

Statistical analysis

Results obtained at different quantification times or with different quantification methods were compared. When comparing sample means, a Student's *t* test was

performed, using MS Excel. Statistical significance was inferred for $p \leq 0.01$.

Results

Protocol designing for *L. pneumophila* biofilm formation

With the aim of describing conditions that support the sessile growth of *L. pneumophila*, three types of media were tested: (i) oligotrophic media and supplemented oligotrophic media, (ii) BBs and SBBs, and (iii) rich medium. Suspensions (10^6 cfu ml⁻¹) of CIP 103854 and HW S2-14 strains were incubated in 6 well-microplate wells for 6 days before confocal observations. Figure 1 presents results obtained with STW (as a representative result for oligotrophic media and BBs, except SBB), BYE and SBB, as maximal intensity projections in the x-y direction (top view) or in the x-z direction (side view).

After 6 days in oligotrophic media or BBs (except SBB), cells adhered to the well surface, as illustrated by Figure 1, and formed a layer of 8.4 ± 0.5 μm above the well surface.

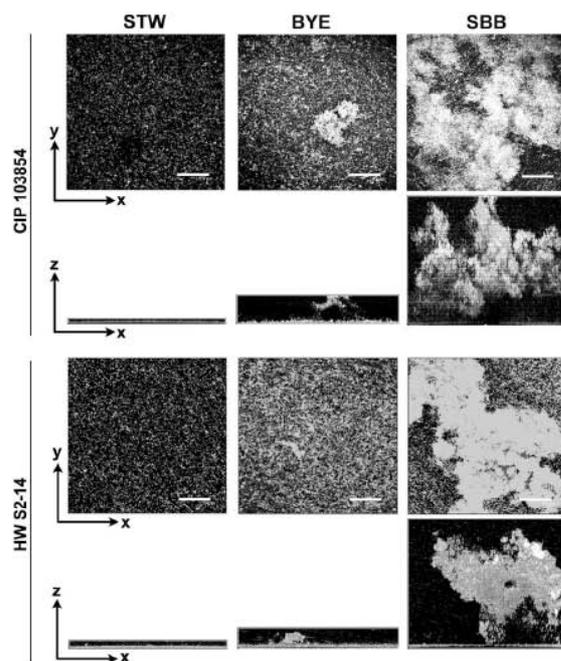


Figure 1. Analyses of 6-day-old biofilms of strain CIP 103854 (top) and HW S2-14 (bottom) produced in sterile tap water (left), buffered yeast extract (center) and supplemented biofilm broth (right) starting from an inoculum of 10^6 cfu ml⁻¹. Biofilms produced in STW are representative of biofilms obtained in oligotrophic media and biofilm broths (except SBB). Images represent maximal fluorescence intensity in top view (x-y) or side view (x-z). Scale bar = 75 μm .

In the rich medium, cells formed a dense layer on the well surface that reached 15.2 ± 1.3 μm in thickness (Figure 1). Aggregates of variable size (from 32 to 64 μm) were disseminated on the cell layer. This type of aggregation is typical in BYE medium and has been described by Mampel et al. (2006). According to the images, more cells adhered to the wells containing BYE than to those containing oligotrophic media or BBs (except SBB). The ability of *L. pneumophila* to replicate planktonically in BYE (Ristroph et al. 1980; Mampel et al. 2006) probably led to a greater accumulation of cells on the well surface, thus resulting in a dense cell layer.

The formation of larger aggregates was observed in wells containing SBB. Under these conditions, bacterial aggregates reached a maximum height of 294.0 μm , as shown in Figure 1. Confocal analysis revealed that a layer of 18.0 ± 5.7 μm was fixed to the well surface. Aggregates were attached by pillars and developed vertically in the bulk medium (see profile images, Figure 1). It was therefore concluded from these experiments that SBB could constitute a good alternative model to produce *L. pneumophila* biofilms. Considering that BYE medium allows biofilm development that is based on planktonic replication (Mampel et al. 2006), planktonic growth in SBB medium was then investigated.

Validation of the growth of *L. pneumophila* in biofilms

Because *L. pneumophila* is a fastidious bacterium, a high number of cfu was initially inoculated in the microplate wells (10^6 cfu ml⁻¹) in order to reduce biofilm formation time. In order to check if biofilm formation originated in the growth of adherent cells or in the deposition of planktonic cells, two assays were performed. First, wells containing SBB were inoculated with low levels of bacteria (10^2 cfu ml⁻¹) of strains CIP 103854 and HW S2-14 and biofilm formation kinetics and planktonic populations were monitored using culture counts.

The results (Figure 2a) indicate that, for a low inoculum, the adhered population increased with incubation time. After 2 h, biofilms consisted of <1 log (cfu cm⁻²). After 12 days, biofilms consisted of an average of 5.72 ± 0.10 log (cfu cm⁻²) for the CIP 103854 strain ($n = 3$) and 6.84 ± 0.03 log (cfu cm⁻²) for HW S2-14 ($n = 2$). Confocal analyses made in parallel clearly showed evolution into a typical biofilm structure (Figure 2b). During the adhesion stage (2 h), only a few dispersed cells adhered to the well surface (data not shown), whereas after 6 days a uniform layer of cells was formed and aggregates were evenly distributed on this basal layer for both strains. This structure was stable over a period of 20 days as long as

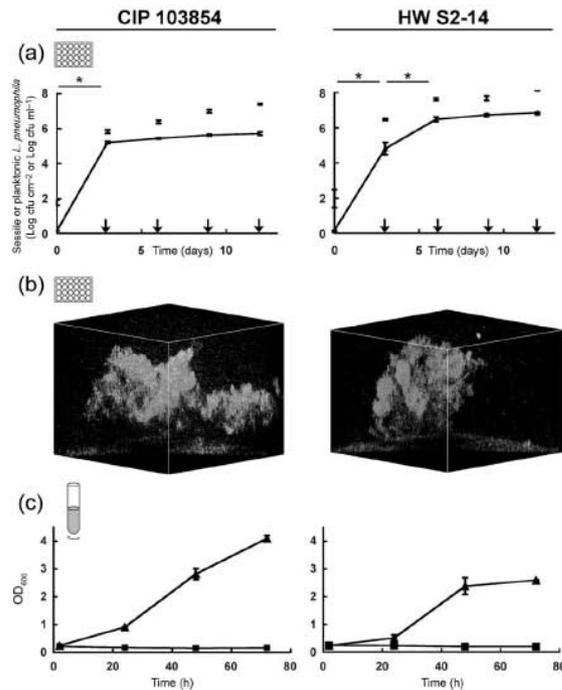


Figure 2. Growth of *L. pneumophila* (CIP 103854 on the left; HW S2-14 on the right) in SBB. (a) Kinetics of *L. pneumophila* biofilm formation (log [cfu cm⁻²], curve) and corresponding planktonic concentrations (log [cfu ml⁻¹], dots) in microplate wells. Inocula consisted of 10² cfu ml⁻¹. Bacteria were first quantified 2 h after inoculation. Arrows, medium renewal in microplate wells; bars, SD ($n = 3$), * p -values ≤ 0.01 between two biofilm quantification times. (b) *L. pneumophila* biofilm structures after 6 days. Images represent volumic reconstitutions of *L. pneumophila* biofilms observed with CLSM. Parallelepiped size is 375 $\mu\text{m} \times 375 \mu\text{m} \times 284 \mu\text{m}$ for CIP 103854 and 375 $\mu\text{m} \times 375 \mu\text{m} \times 265 \mu\text{m}$ for HW S2-14. (c) Planktonic growth of *L. pneumophila* in BYE (▲) or SBB (■) in tubes. Growth was monitored by the OD at 600 nm. Bars = SD ($n = 3$).

the medium was renewed every 3 days (data not shown). Figure 2a shows that planktonic cells in the liquid medium followed the same development pattern as the biofilm population, even if adherent cells grew on a 7.04 cm² surface and planktonic cells developed in 2 ml of medium.

Two hypotheses were possible regarding the origin of the planktonic cells: (i) cells replicated in the planktonic phase and were deposited on the well surface, meaning that growth did not take place in the biofilm, or (ii) cells developed in the biofilm and were released in the planktonic phase. To test these hypotheses, a second test was performed. Suspensions of *L. pneumophila* (ATCC 33125 or HW S2-14) were made in BYE, as a positive control, and in SBB and

incubated with agitation in order to limit biofilm development. Planktonic growth was monitored for 3 days, which correspond to the period between medium renewals in microplate wells. The results are shown in Figure 2c. As expected, in BYE, OD₆₀₀ increased from 0.243 \pm 0.018 to 4.100 \pm 0.106 ($n = 3$, $p < 0.01$) for strain CIP 103854 and from 0.234 \pm 0.017 to 2.597 \pm 0.002 ($n = 3$, $p < 0.01$) for HW S2-14, confirming that both strains were able to grow planktonically in this medium. However, the OD₆₀₀ remained steady in SBB for 3 days at 0.199 \pm 0.033 ($n = 6$, for both strains). The absence of growth was also verified on SBB agar (as opposed to growth observed on the BCYE control, data not shown). These results demonstrate that planktonic growth does not occur in SBB, hence biofilms in microplates result only from the growth of adhered bacteria. This also implies that planktonic cells in the microplate wells (Figure 2a) originate in biofilm cells released in the planktonic phase.

Viability of cells in biofilms

Biofilms can contain cells in different physiological states (viable, viable but not culturable – VBNC, dead cells). q-PCR is a method that allows the quantification of total *L. pneumophila* genome units in a sample, derived from viable cells, VBNC, dead cells, and also eDNA. To verify the proportion of total genome units and culturable cells in biofilms formed in SBB, wells were inoculated with HW S2-14 and also with two other environmental strains (NMW S2-14 and HW S1, 10⁶ cfu ml⁻¹) and biofilm formation was monitored by q-PCR and culture counts. The results are given in Figure 3.

Comparison of the data indicated no significant difference between culture counts and q-PCR results for all the tested strains, with the exception of the HW S2-14 strain after 2 h. 3.47 \pm 0.09 log (cfu cm⁻²) of adhered *L. pneumophila* cells were quantified by cultivation whereas 4.20 \pm 0.08 log (gu cm⁻²) were detected by q-PCR. This difference may be due to the presence of dead or non-cultivable bacteria in the inoculation suspension added to the wells. The strong correlation between the culture and q-PCR results indicate that the majority of the adhered cells in samples were viable and culturable. These results also mean that the method used to collect adhered biomass, involving well scraping, does not damage or induce a high mortality rate of biofilm cells and is effective in dispersing cells. Also, eDNA was not detected in the biofilm, probably because it was present in very low quantities, if at all.

These results were confirmed by staining a HW S2-14 biofilm with BacLight viability kit. Figure 4 shows

814 S. Pécastaings et al.

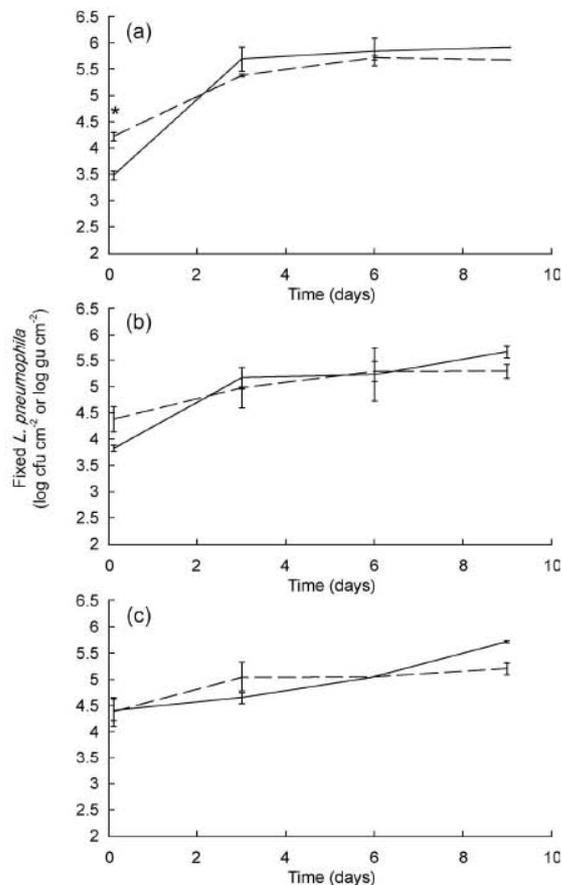


Figure 3. Kinetics of biofilm formation by *L. pneumophila* monitored by culture counts (---, log [cfu cm⁻²]) or q-PCR (—, log [gu cm⁻²]), starting with an inoculum of 10⁶ cfu ml⁻¹. (a) Strain HW S2-14. (b) Strain NMW S2-14. (c) Strain HW S1. Bars = SD (*n* = 2); **p*-values ≤ 0.01 between culture and q-PCR results.

the results obtained on a 7 day-old biofilm (1 day after medium renewal). The image exhibits a majority of green cells in the biofilm, demonstrating that the biofilm was constituted mainly of viable cells and confirming the correlation of culture counts and q-PCR enumeration.

Discussion

L. pneumophila is a fastidious and facultative intracellular bacterium with specific growth needs (Feeley et al. 1978, 1979; Ristroph et al. 1981), hence it is assumed that monospecies proliferation (planktonically or in biofilm) in oligotrophic conditions is limited. In an oligotrophic medium like tap water, mixed species biofilms are considered as initiators for water

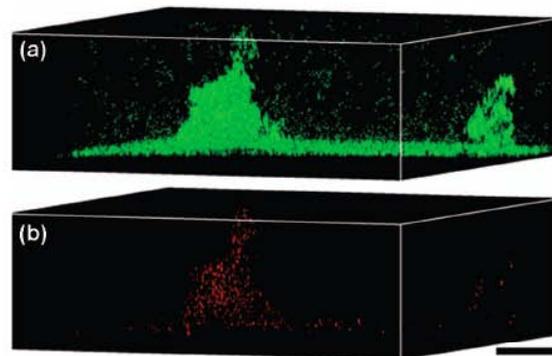


Figure 4. Viability of *L. pneumophila* cells in the biofilm. Images are volumetric reconstructions of a 7-day-old biofilm of strain HW S2-14 (inoculum of 10⁶ CFU ml⁻¹) stained with Syto9 (a, total cells and eDNA) and PI (b, dead or damaged cells, eDNA). Scale bar = 50 μm.

system colonization by *L. pneumophila*. In the environment, biofilms often contain protozoa in which *L. pneumophila* can develop (Murga et al. 2001; Fields et al. 2002; Kuiper et al. 2004). Some bacterial species (Guerrieri et al. 2008; Declerck 2010) and specific algae are also known to enhance *L. pneumophila* development in aquatic environments (Taylor et al. 2009). In this case, *L. pneumophila* seems to profit from nutrients excreted by other species, and is thus considered as a secondary biofilm colonizer. For instance, Temmerman et al. (2006) demonstrated that *L. pneumophila* could grow in oligotrophic media containing heat-killed bacteria (necrotrophic growth), proving that *L. pneumophila* is able to grow independently of eukaryotes. However, interactions with various protozoan or bacterial species make these models poorly reproducible in studying *L. pneumophila* growth in biofilms. Since tap water alone is not sufficient to support *L. pneumophila* growth *in vitro*, a microplate assay using rich medium (BYE) is now used (Piao et al. 2006; Alleron et al. 2008; Hindre et al. 2008). However, Mampel et al. (2006) demonstrated that biofilms produced in these conditions rely on planktonic multiplication.

In the present study, consistent with the literature (Ohno et al. 2003), no sterile oligotrophic medium (sterile distilled water, mineral water or tap water) allowed the growth of *L. pneumophila* biofilms (Figure 1), even if supplemented with iron and cystein. This implies that the oligotrophic media used here did not contain enough nutrients, or appropriate nutrients, to support the sessile growth of *L. pneumophila*. The same is true for the BBs, except for SBB, a medium containing amino acids as a source of carbon and a supplement of iron and cystein. Among the BBs, only

SBB promoted the growth of *L. pneumophila*, more specifically in the biofilm (Figure 2). These results are consistent with previous work showing that the replication of *L. pneumophila* relies on both amino acids as a carbon source (arginine, serine, threonine, cysteine, valine, and methionine (Ristroph et al. 1981)), and on a significant iron concentration (Feeley et al. 1978; Hickey and Cianciotto 1997). In the present study, amino acids were provided by yeast extract, casamino acids, and cystein supplement in SBB, even if their concentration was reduced compared to a rich growth medium like BYE. Hindre et al. (2008) showed that high concentrations of iron (1.25 g l^{-1}) inhibited *L. pneumophila* biofilm formation in rich medium compared to a biofilm grown with 0.25 g l^{-1} of iron. Here, iron concentration was lowered tenfold (25 mg l^{-1}) compared to BYE and this concentration was sufficient to support biofilm growth of *L. pneumophila*.

In the same study, Hindre et al. (2008) showed that the attachment of *L. pneumophila* was better in BYE at low temperatures (20°C) than at higher temperatures (37°C and 42°C). This result is seemingly contradictory with the results of Piao et al. (2006) and with the fact that, in the environment, *L. pneumophila* is most often recovered from warm water systems. In the present study, biofilm production was assayed at different temperatures (22.5 , 37.0 , and 43.0°C , see Supplementary material [Supplementary material is available *via* a multimedia link on the online article webpage]). It was concluded that, even if biofilms were observed at all temperatures when starting with high levels of bacteria (10^6 cfu ml^{-1}), the growth of adherent cells for low initial inocula (10^2 cfu ml^{-1}) was observed only at 37°C .

The protocol designed here is adapted to the formation of single-species biofilms of *L. pneumophila*, of all tested strains, *via* growth of adherent cells. Under the conditions set up in the present study, rinsing eliminated planktonic bacteria every 3 days. A complementary assay showed that planktonic growth was insignificant in SBB during incubation for 3 days if adhesion did not occur (Figure 2). It can be concluded that, in SBB, cells grow only when adhered and that cells colonizing the planktonic phase of the microplate wells are the result mainly of the release of cells actively growing in the biofilm (Figure 2a). Hence, the biofilm acts as a reservoir that allows colonization of the planktonic phase.

The switch between the planktonic state and the sessile state is tightly controlled in bacteria. Various regulatory pathways involving the second messenger cyclic di-GMP have been elucidated (Krasteva et al. 1997; Simm et al. 2004), some of them being sensitive to environmental cues (like the SinI-SinR system in

Bacillus subtilis (Bai et al. 1993; Kearns et al. 2005)). Biofilm development in media not supporting planktonic development has already been described, eg for *P. aeruginosa* (Khalilzadeh et al. 2010) or *Xylophilus fastidiosus* (Leite et al. 2004), and it can be hypothesized that the concentration of nutrients in the medium and/or the composition of the medium constitute signals for the bacteria to develop in a planktonic or a sessile mode.

According to this information, SBB appears to be a good intermediate solution for forming *L. pneumophila* biofilms. It is an intermediate solution between an oligotrophic medium, where *L. pneumophila* is able to survive but not to grow (Ohno et al. 2003), and a rich medium that favors planktonic growth prior to biofilm formation (Mampel et al. 2006). Using a microplate model to grow *L. pneumophila* Philadelphia-1 in a rich medium, Mampel et al. (2006) observed biofilms with a maximum height of $20 \mu\text{m}$ after incubation for 5 days at 30°C . Growing *L. pneumophila* strain Knoxville-1 for 6 days in BYE at 37°C led to the formation of unstructured biofilms $72 \mu\text{m}$ in thickness according to Piao et al. (2006). Biofilms obtained with the protocol described here differed substantially from biofilms produced in a rich medium and displayed characteristic features (Figures 1 and 2b). More specifically, the size of the aggregates reached $\sim 300 \mu\text{m}$ after incubation for 6 days, independently of the initial quantity of bacteria in the wells (10^2 or 10^6 cfu ml^{-1}). This is an indication that the SBB medium, compared to the BYE medium, may favor the production of an extracellular matrix, allowing the structuration of cells into aggregates.

Interestingly, the biofilm and planktonic populations of all tested strains reached a maximum level after incubation for 6 days, and then remained stable for 20 days. The culturable biofilm population level stayed constant even though the medium was renewed every 3 days. This result indicates that sessile and planktonic populations of *L. pneumophila* are regulated in some manner, and that nutrient limitation is probably not the sole cause of that regulation. The microplate model described here, with frequent medium renewal, corresponds to quasi-static conditions. Liu et al. (2006) showed that *L. pneumophila* biofilm colonization was promoted by turbulent flows in a model plumbing system. It would be interesting to further analyze the flow effect on the structure of biofilms formed in SBB.

The physiology of *L. pneumophila* (formation of VBNC cells, cell death) is subjected to change when challenged by stresses such as biocide adjunction, temperature variations, low nutrient availability, or an increase in salt concentration (Ohno et al. 2003; Alleron et al. 2008). Moreover, biofilms are often

constituted of cells in various physiological conditions (Kim et al. 2009) that can sometimes be recovered with difficulty by culture counts. Promising methods such as q-PCR provide rapid quantification of total DNA in a sample from viable, VBNC, damaged and dead cells (Rompre et al. 2002) and eDNA. q-PCR is currently used to complement standard cultivation methods in enumerating *Legionella* spp. and *L. pneumophila* in water (Wellinghausen et al. 2001; Yaradou et al. 2007). Comparing the results from culture and q-PCR methods also gives physiological information about bacteria. For example, in a study by Alleron et al. (2008), the authors described the diminution of culture count results after formation of VBNC cells in their samples (by the addition of monochloramine), while the q-PCR results remained stable. During the biofilm development observed with the present model, no significant difference was observed between colony counts and genome counts, indicating that most DNA detected by q-PCR originated from culturable cells. This conclusion also implies that biofilms did not contain detectable levels of VBNC cells, damaged cells, dead cells, or eDNA.

Syto9/PI staining is another useful method to detect physiological changes in a bacterial population: cells with an intact membrane (viable cells and VBNC cells) appear green (stained with Syto9), whereas damaged cells and eDNA can be observed in the red channel (stained with PI) (Baum et al. 2009; Giao et al. 2009). This method, combined with CLSM, is often used to visualize *in situ* changes in bacterial biofilms subjected to antimicrobial agents (Chiang et al. 2009; Dynes et al. 2009). In the conditions tested here, confocal observations of *L. pneumophila* biofilms stained with Syto9 and PI confirmed that the majority of the biofilm cells were viable *in situ* (green cells, Figure 4) and that damaged bacteria did not have a specific location in the biofilm. These results confirm quantification results obtained by culture and q-PCR that revealed a majority of viable cells in the biofilm.

In conclusion, the present study describes the use of a new medium, SBB, adapted to growing monospecies *L. pneumophila* biofilms, without planktonic growth. *L. pneumophila* biofilms formed under these conditions contain aggregates of cells that can range up to ~300 μm in height, which means that the SBB medium increases biofilm structuration, most likely by favoring the production of an extracellular matrix. This protocol could be useful for further studies concerning sessile *L. pneumophila* cells and the characterization of genes and proteins involved in biofilm formation. CLSM analyses revealed that *L. pneumophila* cells clung together in aggregates but were physically distant from each other (data not

shown), compared to a *P. aeruginosa* biofilm formed in similar conditions (Khalilzadeh et al. 2010). Further characterization of the biofilm matrix composition would provide new insights into *L. pneumophila* biofilm formation and behavior.

Acknowledgements

Sophie Pécastaings is grateful for grants received from the French Association for Thermal Spa Treatments Research (Association Française pour la Recherche Thermale, AFReTh) and the General Council of Les Landes. The authors also express their gratitude to the Regional Council of Midi-Pyrénées and to Genesystems (Bruz, France), for providing a GeneExtract and a GeneDiscCycler device and appropriate reagents for q-PCR analyses. In addition, the authors would like to thank C. Pouzet, Y. Martinez and A. Jauneau from the Microscopy Platform, and the Institut Fédératif de Recherche 40 of CNRS (National Center of Scientific Research) for microscopic analyses.

References

- Alasri A, Roques C, Michel G, Cabassud C, Aptel P. 1992. Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. *Can J Microbiol* 38:635–642.
- Alleron L, Merlet N, Lacombe C, Frere J. 2008. Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* 57:497–502.
- Bai U, Mandic-Mulec I, Smith I. 1993. SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Genes Dev* 7:139–148.
- Baum MM, Kainovic A, O'Keeffe T, Pandita R, McDonald K, Wu S, Webster P. 2009. Characterization of structures in biofilms formed by a *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil. *BMC Microbiol* 9:103–115.
- Berry D, Xi C, Raskin L. 2006. Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr Opin Biotechnol* 17:297–302.
- Bollin GE, Plouffe JF, Para MF, Hackman B. 1985. Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl Environ Microbiol* 50:1128–1131.
- Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P. 2005. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev* 11:355–380.
- Campanac C, Pineau L, Payard A, Baziard-Mouysset G, Roques C. 2002. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1469–1474.
- Chiang WC, Schroll C, Hilbert LR, Moller P, Tolker-Nielsen T. 2009. Silver-palladium surfaces inhibit biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 75:1674–1678.
- Declerck P. 2010. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* 12:557–566.
- Declerck P, Behets J, van Hoef V, Ollevier F. 2007. Replication of *Legionella pneumophila* in floating biofilms. *Curr Microbiol* 55:435–440.

- Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8:881–890.
- Dynes JJ, Lawrence JR, Korber DR, Swerhone GD, Leppard GG, Hitchcock AP. 2009. Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. *Can J Microbiol* 55:163–178.
- Feeley JC, Gorman GW, Weaver RE, Mackel DC, Smith HW. 1978. Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. *J Clin Microbiol* 8:320–325.
- Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, Baine WB. 1979. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 10:437–441.
- Fields BS, Benson RF, Besser RE. 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 15:506–526.
- Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH. 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 41:9–16.
- Giao MS, Wilks SA, Azevedo NF, Vieira MJ, Keevil CW. 2009. Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable *Legionella pneumophila*. *Microb Ecol* 58:56–62.
- Guerrieri E, Bondi M, Sabia C, de Niederhausen S, Borella P, Messi P. 2008. Effect of bacterial interference on biofilm development by *Legionella pneumophila*. *Curr Microbiol* 57:532–536.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95–108.
- Hickey EK, Cianciotto NP. 1997. An iron- and fur-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases. *Infect Immun* 65:133–143.
- Hindre T, Bruggemann H, Buchrieser C, Hechard Y. 2008. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology* 154:30–41.
- Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R, Losick R. 2005. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 55:739–749.
- Khalilzadeh P, Lajoie B, El Hage S, Furiga A, Baziard G, Bergé M, Roques C. 2010. Growth inhibition of adherent *Pseudomonas aeruginosa* by a N-butanoyl-homoserine lactone analog. *Can J Microbiol* 56:1–9.
- Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Kendall AM. 2002. Literature review-efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res* 36:4433–4444.
- Kim J, Hahn JS, Franklin MJ, Stewart PS, Yoon J. 2009. Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 63:129–135.
- Krasteva PV, Fong JC, Shikuma NJ, Beyhan S, Navarro MV, Yildiz FH, Sondermann H. 2010. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science* 327:866–888.
- Kuiper MW, Wullings BA, Akkermans AD, Beumer RR, van der Kooij D. 2004. Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl Environ Microbiol* 70:6826–6833.
- Lasheras A, Boulestreau H, Rogues AM, Ohayon-Courtes C, Labadie JC, Gachie JP. 2006. Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am J Infect Control* 34:520–525.
- Leite B, Andersen PC, Ishida ML. 2004. Colony aggregation and biofilm formation in xylem chemistry-based media for *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiol Lett* 230:283–290.
- Liu Z, Lin YE, Stout JE, Hwang CC, Vidic RD, Yu VL. 2006. Effect of flow regimes on the presence of *Legionella* within the biofilm of a model plumbing system. *J Appl Microbiol* 101:437–442.
- Mampel J, Spirig T, Weber SS, Haagenen JA, Molin S, Hilbi H. 2006. Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Appl Environ Microbiol* 72:2885–2895.
- Molofsky AB, Swanson MS. 2004. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* 53:29–40.
- Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM. 2001. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 147:3121–3126.
- Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K. 2003. Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl Environ Microbiol* 69:2540–2547.
- Piao Z, Sze CC, Barysheva O, Iida K, Yoshida S. 2006. Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 72:1613–1622.
- Pineau L, Roques C, Luc J, Michel G. 1997. Automatic washer disinfectant for flexible endoscopes: a new evaluation process. *Endoscopy* 29:372–379.
- Rasband WS. 1997–2009. ImageJ. Bethesda, Maryland, USA: National Institute of Health.
- Ristroph JD, Hedlund KW, Allen RG. 1980. Liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 11:19–21.
- Ristroph JD, Hedlund KW, Gowda S. 1981. Chemically defined medium for *Legionella pneumophila* growth. *J Clin Microbiol* 13:115–119.
- Rogers J, Keevil CW. 1992. Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl Environ Microbiol* 58:2326–2330.
- Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. 1994. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl Environ Microbiol* 60:1842–1851.
- Rompere A, Servais P, Baudart J, de-Roubin MR, Laurent P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbiol Methods* 49:31–54.
- Samrakandi MM, Roques C, Michel G. 1997. Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. *Can J Microbiol* 43:751–758.
- Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Romling U. 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53:1123–1134.

818 S. Pécastaings et al.

- Stocks SM. 2004. Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry A* 61:189–195.
- Taylor M, Ross K, Bentham R. 2009. *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol* 58:538–547.
- Temmerman R, Vervaeren H, Noseda B, Boon N, Verstraete W. 2006. Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 72:4323–4328.
- Wellinghausen N, Frost C, Marre R. 2001. Detection of legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl Environ Microbiol* 67:3985–3993.
- Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, Andre J, Festoc G, Delabre K, Vandenesch F, et al. 2007. Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Appl Environ Microbiol* 73:1452–1456.

V.2.2 Validation de la température de croissance optimale du biofilm à *L. pneumophila*

Le protocole de formation de biofilm à *L. pneumophila* précédemment décrit a été mis au point en utilisant une température d'incubation de 37 °C, soit l'optimum de croissance de la bactérie sur BCYE. Toutefois, des études menées en milieu riche (BYE) ont permis de montrer que l'adhésion et donc la formation de biofilm était améliorée à 20 °C (Hindre *et al.*, 2008). Par ailleurs, Piao *et al.* (2006) ont démontré que la formation du biofilm à *L. pneumophila* en BYE était dépendante à la fois de la température et du matériau utilisé, les effets observés variant selon les associations température/matériau/souche bactérienne.

Pour vérifier l'influence de la température sur les conditions de formation du biofilm en SBB, le protocole mis au point a été reproduit avec les souches CIP 103854 et HW S2-14 à trois températures d'incubation : 22,5 °C, correspondant à une température plus représentative des conditions environnementales et 43,0 °C, correspondant à une température d'eau mitigée, pouvant être observée au niveau d'un réseau (EMN ou EAP) et 37 °C.

Les biofilms des 2 souches formés aux trois températures en milieu SBB ont été étudiés après 6 jours d'incubation. Des biofilms formés à partir de deux types d'inoculum (fort, 10⁶ UFC/mL ou faible, 10² UFC/mL) ont été comparés en termes de structure (par observation en microscopie confocale) et de biomasse cultivable adhérente (par dénombrement sur BCYE à 6 j). La Figure V-1 présente les résultats obtenus.

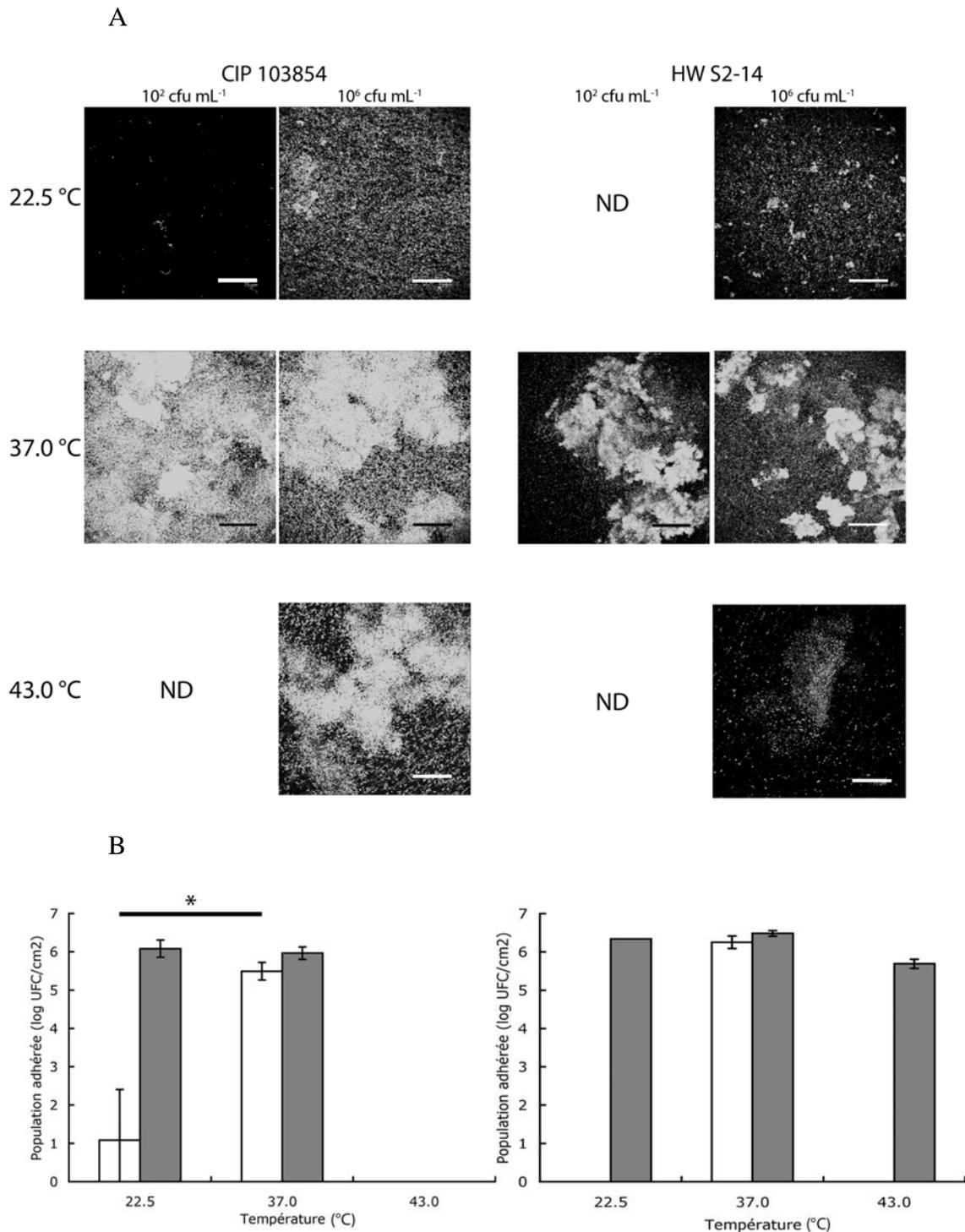


Figure V-1. A. Biofilms de 6 jours observés par microscopie confocale, formés à 22,5 °C, 37,0 °C et 43,0 °C (projections maximales, souches CIP 103854 et HW S2-14). Les barres représentent 75 µm (ND = bactéries non détectées). B. Biomasse viable et cultivable adhérente après 6 j d'incubation en milieu SBB en fonction de la température (n =2). Les histogrammes blancs correspondent à un inoculum de 10² UFC/mL et les histogrammes gris un inoculum de 10⁶ UFC/mL.

Partant d'une faible quantité de bactéries inoculées (10^2 UFC/mL), peu ou pas de bactéries adhérees ont été visualisées à 22,5 °C ou 43,0 °C (voir Figure V-1. A.). Les agrégats bactériens se sont développés uniquement à 37,0 °C. Ces observations correspondent aux résultats obtenus par numération des UFC (Figure V-1. B.).

Pour un inoculum fort (10^6 CFU/mL), on constate que les 2 souches de *L. pneumophila* ont adhéré au polystyrène de la microplaque, quelle que soit la température d'incubation. Toutefois, les biofilms observés à 22,5 et 43 °C diffèrent de ceux formés à 37 °C : à 22,5 °C un tapis bactérien et quelques agrégats de petite taille (<30 µm) se sont formés, tandis qu'à 43,0 °C des agrégats bactériens à 150 µm ont été mis en place, mais de taille inférieure, avec cependant une faible densité cellulaire (voir Figure V-1. B.).

Les essais effectués montrent que, à 22,5 °C et 43,0 °C, le biofilm est détecté uniquement lorsque la quantité de bactéries inoculées est élevée. Ces résultats semblent indiquer soit que l'adhésion est limitée, soit que la multiplication bactérienne, une fois les bactéries adhérees, est trop faible pour conduire à une formation de biofilm détectable selon les méthodes mises en œuvre (observation et dénombrement des UFC). Ainsi, dans ces conditions, il est difficile de définir si la formation de biofilm correspond à un dépôt des bactéries inoculées, une multiplication des bactéries adhérees ou une combinaison des deux phénomènes.

Il est par ailleurs intéressant de constater que, dans le cas de la souche CIP 103854 (inoculum 10^6 UFC/mL), des agrégats ont été observés à 43,0 °C après 6 j d'incubation, mais aucune bactérie cultivable n'a été détectée par numération des UFC. Ceci indiquerait un passage à un état non cultivable dans ces conditions, à confirmer par qPCR et double marquage des bactéries par le Syto 9 et l'IP.

V.2.3 Caractérisation de la matrice du biofilm à *L. pneumophila*

Les observations par microscopie confocale ont révélé une bonne structuration du biofilm à *L. pneumophila*, mais toutefois relâchée. Comme le montre la Figure V-2, qui présente un zoom

effectué sur un agrégat cellulaire, les cellules ne sont pas en contact direct. Ainsi, l'hypothèse d'une matrice maintenant cette architecture et permettant la cohésion de cellules éloignées a été émise. Les biofilms comportent généralement des matrices de nature complexe à base d'ADN, de lipides ou de protéines. Les composants majeurs décrits sont toutefois de nature polysaccharidique, c'est pourquoi notre intérêt s'est d'abord porté sur ces molécules.

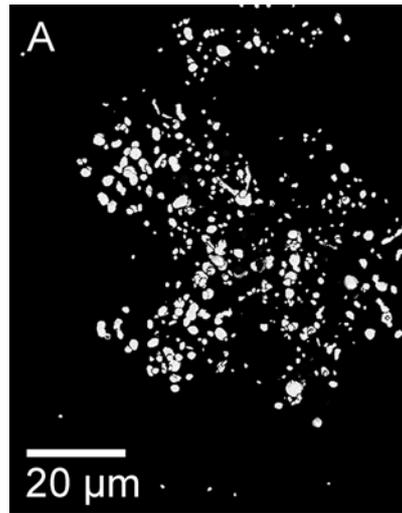


Figure V-2. Reconstitution volumique d'un agrégat dans un biofilm de 9 jours (souche HW S2-14) montrant l'éloignement des cellules au sein d'un même agrégat.

Dans un premier temps, une recherche des polysaccharides de surface des cellules de *L. pneumophila* par coloration au rouge Congo a été réalisée. La bactérie a été cultivée sur BCYE + Rouge Congo (RC). Le RC est une molécule pouvant être séquestrée par certains polysaccharides ainsi que les filaments protéiques (tels que les curli) (Lee *et al.*, 2007). La croissance de bactéries sur milieux supplémentés en RC permet donc de discriminer des colonies productrices de polysaccharides ou filaments protéiques (rouges) des autres colonies (blanches) (Chapman *et al.*, 2002). Les essais menés sur *L. pneumophila* n'ont fait apparaître aucune coloration (données non fournies) lors de la culture sur agar. Une autre technique a donc été envisagée, afin d'évaluer la production d'exopolysaccharides au sein de la structure biofilm, cette synthèse pouvant être induite/régulée, en fonction des conditions de culture de la bactérie.

La technique de Fluorescent Lectin Binding Analysis (Neu *et al.*, 2001) a été choisie puisqu'elle présente l'avantage de mettre en évidence les carbohydrates dans les matrices de biofilms non dénaturés, par microscopie confocale. La lectine choisie ici est la Concanavalline

A, conjuguée à l'Alexa 633 pour le marquage des résidus manopyranosyl et glucopyranosyl (ConA-A633). La souche HW S2-14 a été utilisée pour former des biofilms en SBB, marqués au 15^{ème} jour par le Syto9 et la ConA-A633. La Figure V-3 est une reconstitution en 3 dimensions d'un agrégat du biofilm.

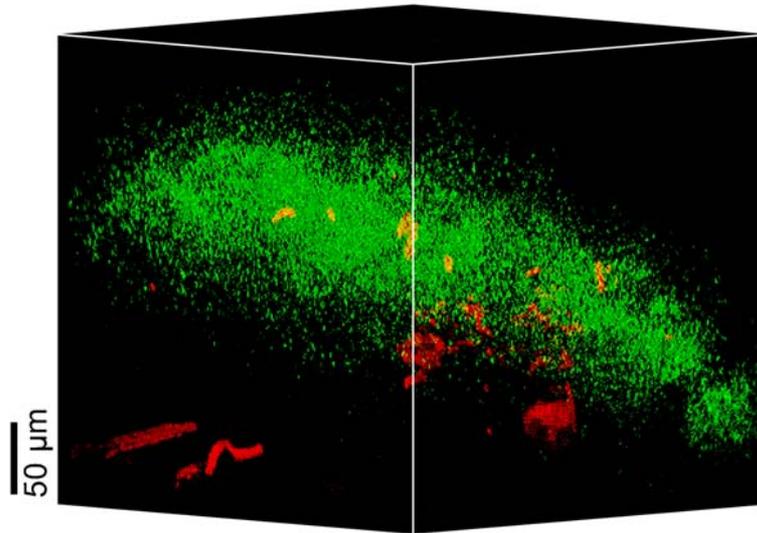


Figure V-3. Distribution volumique des résidus carbohydrates au sein d'un biofilm à *L. pneumophila* de 15 jours. Vert, Syto 9. Rouge, ConA-A633.

Les résultats montrent que de petits amas de carbohydrates sont présents dans le biofilm de *L. pneumophila*. La ConA-A633 révèle une répartition particulière des carbohydrates, qui peuvent prendre la forme de petits agrégats ou de feuillets, parfois localisés en périphérie des agrégats bactériens. Bien que la technique FLBA soit qualitative, on remarque un marquage faible au sein même de l'agrégat, entre les cellules. D'autre part, les polysaccharides visualisés n'englobent pas l'ensemble du biofilm comme la matrice des biofilms de *P. aeruginosa* (Strathmann *et al.*, 2002). Il apparaît donc que d'autres composés (ou d'autres carbohydrates que ceux identifiés par la ConA) sont impliqués dans la composition de la matrice.

Dès 1979, il a été démontré que les sources de contaminations par la bactérie *L. pneumophila* provenaient des réseaux d'eau contaminés. Plus récemment, le rôle des biofilms a été mis en évidence dans le maintien de la bactérie au sein des réseaux d'eau, mais, à l'heure actuelle, aucun modèle expérimental *in vitro* ne permet de reconstituer des biofilms mono-espèce de *L. pneumophila* en milieu appauvri, proche des conditions réelles de formation.

Dans cette étude, la souche de référence CIP 103854 (séro groupe 1) et trois isolats environnementaux de *L. pneumophila* (séro groupe 1 et 2-14) ont été utilisés pour produire des biofilms en microplaques 24-puits, grâce à un milieu de culture spécifique, SBB, milieu à base d'éléments minéraux et d'un apport carboné sous forme d'acides aminés notamment, de concentrations réduites. Le protocole prévoit une incubation à 37 °C pour une croissance optimale et l'élimination tous les trois jours des bactéries planctoniques, ce qui favorise la formation, après 6 jours d'incubation, de biofilms présentant des agrégats de 300 µm. Les quantifications des cellules du biofilm par culture sur boîte ou qPCR, ainsi que les marquages de viabilité des cellules du biofilm ont permis de montrer que la majorité des cellules étaient viables et cultivables. Enfin, des études préliminaires de la composition de la matrice ont mis en évidence la présence de petits agrégats ou de feuillettes de carbohydrates dispersés au sein des agrégats cellulaires du biofilm.

Par ailleurs, il a été démontré que la croissance bactérienne se produisait à l'intérieur de la communauté fixée, et non pas dans le milieu liquide, sous forme planctonique, comme c'est le cas pour le milieu BYE.

Ce modèle constitue donc un protocole innovant, permettant la formation de biofilms mono-espèces de *L. pneumophila* différents de ceux formés en milieu riche. Cette méthode présente plusieurs intérêts, notamment la possibilité d'étudier la physiologie et les gènes impliqués dans la formation du biofilm chez *L. pneumophila*. Dans la suite de ces travaux, nous présentons l'étude préliminaire sur l'activité bactéricide d'un traitement biocide, le choc thermique, sur des biofilms de *L. pneumophila*.

V.3 Évaluation de l'activité du choc thermique sur *L. pneumophila*

V.3.1 Activité bactéricide in vitro du choc thermique sur biofilms à *L. pneumophila*

La mise en place du modèle de formation de biofilm à *L. pneumophila* en microplaque a abouti à la réalisation d'essais de désinfection du biofilm par un choc thermique à 80 °C. Lors de cet essai, un biofilm de la souche HW S2-14 âgé de 9 jours a été incubé pendant 1 h à 80 °C, puis les bactéries restantes après le choc ont été quantifiées par culture sur BCYE. Des biofilms ayant subi un choc thermique ont également été à nouveau incubés pendant 3 et 6 jours pour vérifier une recolonisation potentielle du milieu de culture par la bactérie.

Tableau V-1. RL (moyenne±écart-type) engendrée par un choc thermique à 80 °C de 1 h sur biofilms de *L. pneumophila* (n=2).

Nombre initial d'UFC dans les puits (log UFC/puits)	RL (log)
6,91±0,05	6,91±0,05

Le biofilm formé après 9 jours était constitué de 6,91±0,05 UFC/cm² avant la désinfection. Après désinfection, aucune bactérie cultivable n'a été détectée, immédiatement après le choc ou jusqu'à 6 jours après le traitement (Tableau V-1).

Le choc thermique semble donc efficace pour la désinfection d'un biofilm à *L. pneumophila* formé en milieu SBB. Toutefois, ces résultats sont à nuancer, étant donnée la technique de numération sur boîte utilisée pour quantifier les bactéries après choc. Les traitements de désinfection (thermique ou par la monochloramine) ont pour effet d'entraîner la formation de VBNC chez les populations de *L. pneumophila* (Allegra *et al.*, 2008; Alleron *et al.*, 2008), qui ne sont pas quantifiables par culture. Des techniques de quantifications alternatives (qPCR, cytométrie de viabilité) sont donc à envisager pour la suite des essais.

V.3.2 Évaluation in situ d'un choc thermique sur une contamination à *L. pneumophila* en réseau d'eau minérale naturelle

Dans la première partie de cette thèse, nous avons pu constater que *P. aeruginosa* est une bactérie formant facilement des biofilms, d'où sa résistance aux traitements biocides. Cette résistance, ou plutôt réduction de sensibilité, a été notamment illustrée lors des essais sur biofilms obtenus en microplaque et ceux menés sur réseau-pilote. Lors de ces derniers essais, les traitements ont permis l'élimination transitoire de la bactérie dans l'EMN, sans parvenir à éradiquer complètement la contamination : la bactérie était à nouveau détectée quelques jours après le traitement.

Dans les paragraphes précédents, nous avons également vu que *L. pneumophila* était une bactérie capable de former des biofilms dans certaines conditions, ce qui pourrait avoir une implication dans sa résistance aux traitements de désinfection. Pour vérifier si le comportement de *L. pneumophila* est semblable à celui de *P. aeruginosa* en conditions de traitement réelles, nous avons donc procédé à des contaminations du réseau-pilote. Le choix s'est porté sur une souche environnementale de *L. pneumophila* (souche HW S2-14) pour la réalisation des essais plutôt qu'une souche de référence, afin d'optimiser la contamination du réseau. Ces résultats sont également décrits dans un article paru dans la « Presse Thermale et Climatique » (Annexe 6).

Deux essais indépendants ont été menés et ont permis d'évaluer l'efficacité *in situ* d'un choc thermique. La contamination du réseau a été réalisée à partir d'une suspension de 300 mL de *L. pneumophila* ($(6,55 \pm 0,64) \times 10^6$ UFC/mL) inoculée au niveau du ballon du réseau préalablement rempli d'EMN. Le réseau a ensuite été utilisé quotidiennement pendant 1 h. La contamination du réseau par *L. pneumophila* a été suivie pendant 16 ou 22 jours, par des analyses au niveau des 11 points de prélèvements du réseau. La recherche de *L. pneumophila* s'est effectuée sur 2x1 L d'EMN par dénombrement par culture sur GVPC et qPCR. Cependant, la technique par culture ayant mené à des résultats ininterprétables (présence d'une flore interférente importante empêchant la lecture), seuls les résultats de qPCR ont été exploités.

Les autres paramètres microbiologiques (coliformes dans 250 mL, entérocoques dans 250 mL, spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices dans 100 mL, *P. aeruginosa* dans 250

mL) ont été suivis par les méthodes classiques de culture sur boîte. Aucune de ces bactéries n'a été détectée dans les volumes indiqués durant les deux essais. Le pH, la température, la pression et les concentrations ioniques de l'EMN n'ont pas varié anormalement au cours des essais.

Pendant les essais, des chocs thermiques ont été appliqués (EAP à 80 °C mise en circulation pendant 1 h 30 min dans le réseau, circuit fermé). Un choc thermique unique a été appliqué lors de l'essai 1, à 15 j. Deux chocs thermiques ont été appliqués au cours de l'essai 2, à 6 j et à 15 j (Figure V-4). La contamination initiale du réseau s'élevait à $6,25 \pm 0,52$ log UG/L dans l'eau en circulation 2 ou 3 jours après l'inoculation en moyenne ($n=2$).

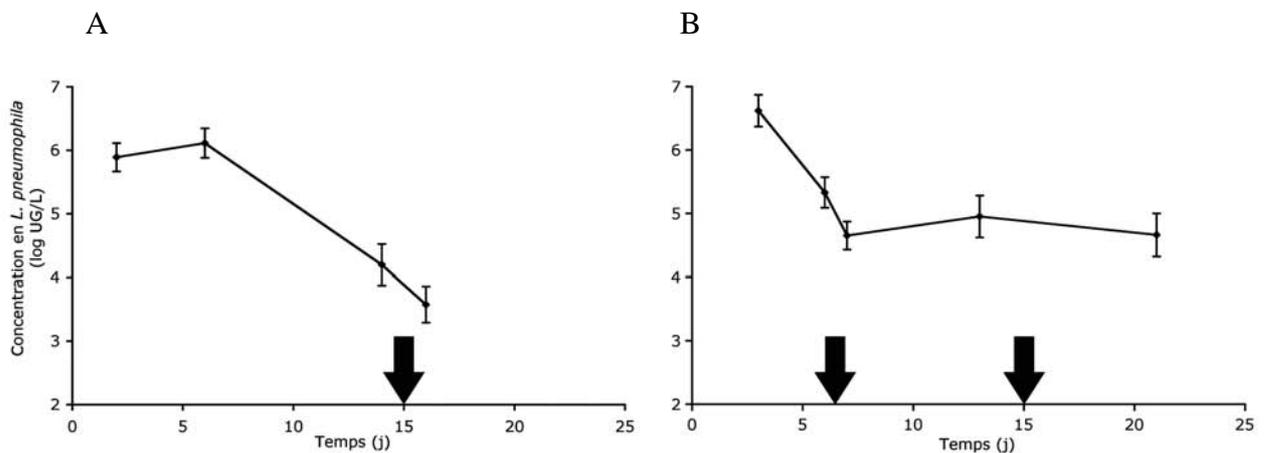


Figure V-4. Évolution de la concentration en *L. pneumophila* dans l'EMN en circulation dans le réseau-pilote (moyennes ± écarts-types). A. Essai 1. B. Essai 2. Les flèches représentent les chocs thermiques à 80 °C.

La Figure V-4 A montre les résultats obtenus lors du premier essai et indique que la contamination initiale en *L. pneumophila* ne s'est pas maintenue dans le réseau. Le niveau de *L. pneumophila* est en effet passé de $5,89 \pm 0,22$ log UG/L (2 j) à $4,20 \pm 0,32$ log UG/L (14 j). On observe également une diminution de la concentration en *L. pneumophila* dans le réseau suite au choc thermique ($p < 0,01$). Cette diminution de concentration ne peut pas être attribuée à la seule réalisation du choc thermique, la concentration en *L. pneumophila* n'étant pas stabilisée dans le réseau. Cependant, il apparaît déjà clairement que le choc thermique ne permet pas d'obtenir une réduction totale de la contamination ($3,57$ log UG/L encore

présentes après le choc).

Lors du deuxième essai (Figure V-4 B), les concentrations initiales en *L. pneumophila* dans l'EMN en circulation dans le réseau ont varié entre $6,62 \pm 0,25$ et $4,66 \pm 0,34$ log UG/L. Une diminution de la concentration en *L. pneumophila* a été observée à la suite du premier choc thermique, mais comme dans le cas du premier essai, la concentration n'était pas stable et la diminution ne peut pas être attribuée au seul choc thermique. Ce premier choc, associé à la diminution de flore au sein du réseau, ne permet pas une réduction drastique de la population présente. Un second choc thermique a donc été appliqué au jour 15 et n'a engendré aucune variation de la concentration en UG au sein du réseau. La concentration dans le réseau est restée uniformément stable du jour 7 au jour 22 et à des taux nettement supérieurs aux limites acceptables.

Les études de traitements bactéricides sur *L. pneumophila* n'ont, pour le moment, concerné que le choc thermique à 80 °C. Ce traitement a en premier lieu été appliqué à des biofilms de *L. pneumophila* formés *in vitro* en milieu SBB. Les quantifications effectuées après traitement par culture sur boîte n'ont pas permis de détecter de bactérie cultivable. Cependant, ce traitement pouvant entraîner la formation de bactéries sous forme VBNC, il serait intéressant de poursuivre les essais en utilisant des techniques de quantifications alternatives.

Dans un deuxième temps, des essais en réseau-pilote ont été effectués. Les résultats obtenus sur réseau contaminé par *P. aeruginosa* ont permis de montrer qu'un traitement par choc thermique avait une efficacité transitoire : immédiatement après traitement, aucune bactérie cultivable n'était détectée dans le réseau, alors que quelques jours après le choc, quatre points de prélèvements présentaient à nouveau une contamination. Dans le cas de *L. pneumophila*, les essais ont montré que le choc thermique n'induisait aucune diminution de la concentration bactérienne (en log UG/L) dans l'eau du réseau, quel que soit le point de prélèvement considéré. De tels échecs de désinfection ont déjà été décrits dans la littérature et ont souvent plusieurs origines. L'ensemble de ces résultats sera discuté dans le paragraphe V.4. Les techniques de détection utilisées dans les essais *in vitro* et *in situ* doivent, quoiqu'il en soit, être harmonisées afin de mieux comprendre les différences de sensibilité de la bactérie dans les 2 types d'essais et éventuellement détecter la présence de bactéries sous forme VBNC.

V.4 Discussion

La discussion concernant la mise au point du modèle de formation du biofilm en microplaque est détaillée dans l'article « Sessile *Legionella pneumophila* is able to grow on surfaces and generate structured mono-species biofilms » et ne sera donc pas reprise ici.

V.4.1 Recherche de la température optimale pour la formation de biofilms en milieu SBB

L. pneumophila est une bactérie sensible à la température et qui se développe préférentiellement entre 25 et 44 °C (Fields *et al.*, 2002; Konishi *et al.*, 2006). Dans les réseaux, *L. pneumophila* est le plus souvent isolée à partir d'eaux dont la température est comprise entre 30 et 40 °C (Rogers *et al.*, 1994; Steinert *et al.*, 2002). Dans cette étude, les essais menés à 22,5 °C, 37,0 °C et 43,0 °C ont montré que la croissance sur milieu gélosé BCYE de la souche CIP 103854 n'était observée qu'à 37,0 °C, alors que la souche environnementale HW S2-14 pouvait se développer à toutes les températures testées (données non fournies). Ce résultat confirme des sensibilités différentes à la température des souches de *L. pneumophila*.

Les résultats de formation de biofilms à différentes températures ont permis de montrer qu'en milieu SBB, les deux souches se comportent de manière similaire même si leur sensibilité à la température diffère sur BCYE. Les deux souches testées forment des biofilms, quelle que soit la température, du moment que l'inoculum est fort (10^6 UFC/mL). On constate toutefois que les biofilms formés à 22,5 °C sont constitués d'une couche de cellules comportant quelques agrégats de taille inférieure ou égale à 30 µm. À 43,0 °C, des agrégats de tailles plus importantes ont été observés (150 µm), mais la densité cellulaire est inférieure à celle des biofilms formés à 37,0 °C (Figure V-1. A.). Dans le cas de la souche CIP 103854, les agrégats formés à 43,0 °C ne contiennent aucune bactérie cultivable (Figure V-1) : les bactéries observées sont donc soit mortes, soit sous forme de VBNC. Il est important de noter que 10^6 UFC/mL ont été inoculées dans ces puits. Or la quantification finale fait apparaître que les biofilms contiennent environ 10^6 UFC/cm² (pour une surface totale de 7,04 cm²). Ainsi les biofilms formés à 22,5 °C ou 43 °C ne résultent très probablement pas d'une croissance, mais

plutôt du dépôt et d'une faible structuration des bactéries inoculées (petits agrégats).

Cette hypothèse est appuyée par les résultats obtenus lorsque les puits ont été inoculés par de faibles quantités de bactéries (10^2 UFC/mL). Ainsi, après 6 j d'incubation à 22,5 °C et 43,0 °C peu ou pas de bactéries sont détectées (par microscopie ou quantification sur boîtes), ce qui confirme que la croissance des bactéries sous forme adhérente n'a pas pu avoir lieu dans ces puits (adhésion faible ou nulle ou taux de multiplication trop faible sous cette forme). Au contraire, à 37,0 °C, des biofilms contenant 5,5 à 6 log UFC/cm² sont observés après 6 jours d'incubation, ce qui démontre que l'adhésion et secondairement la croissance des bactéries adhérentes ont bien eu lieu dans ces conditions.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que la température optimale pour une croissance de *L. pneumophila* au sein du biofilm en milieu SBB est de 37,0 °C. Ces résultats semblent entrer en contradiction avec l'étude de Hindré *et al.* (2008) dans laquelle les auteurs ont constaté que le biofilm formé à 20 °C au bout de 8 j par *L. pneumophila* en milieu riche (BYE) était plus stable (meilleure adhésion) qu'à 37 ou 42 °C. Par ailleurs, Piao *et al.* (2006) ont démontré que le biofilm formé par *L. pneumophila* en milieu BYE sur polystyrène était plus important à 37 °C et 42 °C qu'à 25 °C (quantification par Cristal Violet), alors que sur polypropylène, l'adhésion était meilleure à 25 °C. Il est à noter que, dans ces deux études, l'inoculum était élevé (environ 10^7 UFC/mL). Les résultats ne permettent donc pas de déterminer si, dans ces conditions, le biofilm était généré par adhésion des cellules inoculées, des cellules issues de la croissance planctonique ou par multiplication des bactéries sessiles.

L'étude de Piao *et al.* (2006) fournit des observations par microscopie confocale de biofilms de *L. pneumophila* formés à différentes températures (25 °C après 18 j d'incubation et 37 °C après 6 j d'incubation) sur du verre en milieu BYE (sans renouvellement de milieu). Les reconstitutions de profil montrent la formation de quelques amas à 25 °C (hauteur inférieure à 20 µm) et l'absence de structure à 37 °C, le biofilm formant une couche uniforme d'environ 70 µm (Figure V-5).

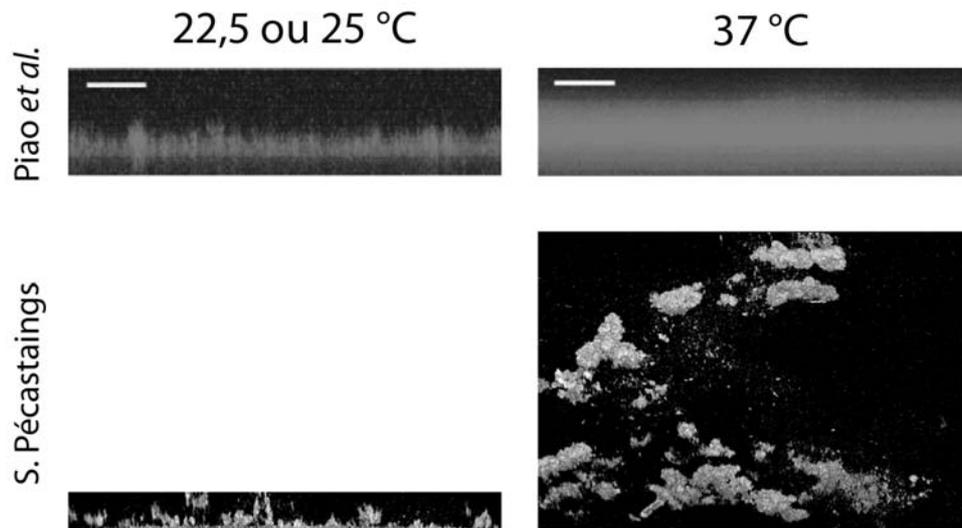


Figure V-5. Comparaisons des biofilms à *L. pneumophila* formés en BYE (Piao *et al.*, 2006) à 25 °C (en haut à gauche) et à 37 °C (en haut à droite) et en SBB à 22,5 °C (en bas à gauche) et à 37 °C (en bas à droite). Échelle = 50 µm.

Dans la présente étude, les biofilms formés en milieu SBB se distinguent nettement des biofilms formés en BYE, plus particulièrement à la température de 37 °C, qui permet la formation d'agrégats atteignant 300 µm dès 6 j d'incubation (voir Figure V-5) provenant spécifiquement de la multiplication des bactéries adhérees.

V.4.2 Composition de la matrice du biofilm à *L. pneumophila* en milieu SBB

L'utilisation de la ConA-A633 a permis la visualisation de carbohydrates (plus spécifiquement les résidus mannose et glucose de ces carbohydrates) dans la matrice des biofilms à *L. pneumophila* formés en SBB. Cette méthode a révélé des répartitions différentes des polysaccharides chez d'autres espèces, comme *P. aeruginosa* (souche PAO1) par exemple. Chez PAO1, les cellules sont complètement incluses dans cette matrice (Strathmann *et al.*, 2002). La microscopie confocale a aussi montré que le biofilm d'*E. coli* comportait une matrice uniforme d'EPS (Maeyama *et al.*, 2004). De façon inattendue, les biofilms de *L. pneumophila* contiennent des carbohydrates disséminés sous formes de petits agrégats ou feuilletés localisés à l'intérieur ou en périphérie des agrégats cellulaires. L'origine de ces résidus n'est pas déterminée. La production d'exopolysaccharides par *L. pneumophila* n'a jamais été décrite et certains auteurs considèrent que cette bactérie est incapable de produire

des polysaccharides (Luneberg *et al.*, 1998). Cependant, il a déjà été démontré que *L. pneumophila* peut libérer le lipopolysaccharide (LPS) de sa surface afin d'inhiber la fusion du phagosome et du lysosome chez les macrophages (Fernandez-Moreira *et al.*, 2006). La structure et la composition du LPS de *L. pneumophila* sont bien connus. On sait notamment que le noyau oligosaccharide contient deux résidus mannose qui peuvent potentiellement être liés par la ConA (Kooistra *et al.*, 2002). Le LPS joue par ailleurs un rôle important dans la formation du biofilm chez d'autres espèces bactériennes comme *Porphyromonas gingivalis* ou *Vibrio cholerae* (Nesper *et al.*, 2001; Nakao *et al.*, 2006).

V.4.3 Essai de désinfection d'une contamination par *L. pneumophila* en réseau-pilote

Les travaux menés en réseau-pilote représentent une technique de choix pour l'étude de l'efficacité de désinfectants ou traitements sur une contamination par des micro-organismes problématiques. Ces études présentent l'avantage d'intégrer plusieurs paramètres pouvant être à l'origine des échecs de désinfection sur réseaux, contrairement aux études menées en laboratoire : présence de biofilm (Storey *et al.*, 2004), influence du matériel constitutif des réseaux (Rogers *et al.*, 1994), bras morts (Farhat *et al.*, 2010)... Ainsi, de nombreuses études concernant la désinfection de *L. pneumophila* sont menées en réseau-pilote mais abordent seulement la problématique des réseaux d'eau chaude. La contamination d'EMN par *L. pneumophila* est peu décrite (Leclerc *et al.*, 2002; Ohno *et al.*, 2003) et peu d'études concernent à ce jour la désinfection des réseaux d'EMN (Costa *et al.*, 2010).

Lors de ces essais, le choix de la souche s'est porté sur un isolat environnemental (HW S2-14) issu d'un réseau d'EAP plutôt que sur une souche de référence, théoriquement plus sensible aux traitements. La souche choisie a, d'autre part, été testée *in vitro* pour sa capacité à former des biofilms. Les résultats du paragraphe V.2 ont démontré sa capacité à former des biofilms *in vitro* et que ces biofilms étaient sensibles à un choc thermique à 80 °C.

Sur le réseau-pilote, la concentration de *L. pneumophila* dans l'EMN a été évaluée par qPCR uniquement, les quantifications sur milieu de culture GVPC étant inexploitable (légionelles non dénombrées du fait de la présence d'une flore interférente importante). La qPCR est de

plus en plus utilisée pour le dénombrement des légionelles dans l'eau en complément de la méthode classique par culture (Wellinghausen *et al.*, 2001; Stolhaug *et al.*, 2006; Yaradou *et al.*, 2007; Dusserre *et al.*, 2008). En France, cette méthode de détection a récemment été publiée en tant que norme par l'AFNOR (AFNOR, 2010). Cette méthode présente l'avantage de fournir des résultats en quelques heures alors que 15 jours peuvent être nécessaires pour obtenir des résultats définitifs par culture.

Toutefois, la qPCR permet de quantifier l'ADN, c'est-à-dire le nombre théorique d'unités génomes de *L. pneumophila* dans un échantillon, ce qui comprend les bactéries cultivables, les bactéries viables non-cultivables, les bactéries mortes et l'ADN libre (Yaradou *et al.*, 2007). Ainsi de nombreuses études comparant ces deux techniques de quantification montrent que les résultats obtenus par qPCR sont généralement plus élevés que les résultats obtenus par culture (Wellinghausen *et al.*, 2001; Yaradou *et al.*, 2007; Farhat *et al.*, 2010). Plus particulièrement, les variations de résultats de la culture et de la qPCR sont souvent expliquées par la provenance des échantillons. Yaradou *et al.* (2007) ont par exemple montré une bonne corrélation des résultats obtenus par culture et qPCR dans des échantillons d'eau chaude sanitaire, mais pas dans des échantillons de tours aérorefrigérantes, contenant souvent des inhibiteurs de PCR. Dans la présente étude, les échantillons issus du réseau-pilote étaient constitués d'EMN contenant, *a priori*, peu d'inhibiteurs de PCR. Toutefois, de nouveaux essais utilisant les deux techniques de quantification sont nécessaires afin de préciser la cohérence des résultats et de préciser l'état physiologique des bactéries présentes dans le réseau.

Ces essais ont permis, d'autre part, de montrer que le choc thermique était peu efficace contre une contamination à *L. pneumophila* en réseau d'EMN : seul le second choc thermique effectué lors du second essai a été réalisé lorsque la concentration en légionelles dans l'EMN était stable. Ce choc n'a cependant pas été suivi d'une baisse de la concentration en légionelles en suspension dans l'EMN.

Les études menées sur l'efficacité du choc thermique sur une contamination par *L. pneumophila* en réseaux aboutissent souvent à des résultats contradictoires. Ces contradictions ont pour origine plusieurs facteurs dont la nature de l'eau utilisée (eau chaude sanitaire, de dialyse, de tours aérorefrigérantes), la nature de l'inoculum (souche de référence

ou environnementale, eau de rivière), la conception du réseau (régime d'écoulement, présence de bras morts) et notamment le matériau constitutif (cuivre, INOX, PVC...) et la technique de détection (culture, qPCR, Fluorescent In Situ Hybridization). Par exemple, les résultats obtenus par Muraca *et al.* (1987), Storey *et al.* (2004) ou Saby *et al.* (2005), tendent à montrer que la contamination par *L. pneumophila* peut être efficacement contrôlée par le maintien d'une température supérieure à 55 °C en tous points d'un réseau d'eau chaude, ou bien par des chocs thermiques ponctuels à 80 °C. Par opposition, l'étude de Farhat *et al.* (2010), qui décrit la réalisation d'un traitement thermique sur un pilote contaminé par *Legionella*, n'aboutit pas aux mêmes conclusions. La quantification de légionelles dans le réseau a été effectuée par culture et qPCR dans l'eau chaude en circulation ainsi que dans le biofilm à la surface des canalisations. Lors d'un premier essai, les auteurs ont constaté une baisse transitoire de la concentration en légionelles cultivables dans l'eau du réseau et dans le biofilm, alors que la concentration obtenue par qPCR était stable. Le second essai n'a engendré aucune baisse de la concentration en légionelles, dans l'eau ou dans le biofilm, mesurée par culture sur GVPC ou par qPCR. Les essais menés dans la présente étude n'ont pas inclus la quantification du biofilm fixé sur les canalisations. La souche utilisée (HW S 2-14) étant capable de former des biofilms *in vitro*, on peut envisager qu'un biofilm ait permis la persistance de bactéries viables et donc la re-colonisation du réseau-pilote après le traitement. Lors de ces essais, la quantification des bactéries a été réalisée uniquement sur bactéries planctoniques en circulation dans l'EMN. Ainsi, il faut envisager l'évolution du réseau-pilote afin de permettre le suivi de la population adhérente et donc l'impact du biofilm sur la contamination du réseau.

Des légionelles ayant subi un traitement biocide (par la chaleur ou chimique) ont également la capacité d'entrer dans un état VBNC (Allegra *et al.*, 2008; Alleron *et al.*, 2008). Ces bactéries peuvent retrouver leur pouvoir infectieux, notamment par coculture avec des amibes (Steinert *et al.*, 1997). Récemment, Dusserre *et al.* (2008) ont décrit une méthode innovante de qPCR avec marquage de viabilité permettant de détecter uniquement les bactéries viables (cultivables ou non) d'un échantillon. La comparaison des résultats obtenus par qPCR classique et qPCR avec marquage de viabilité permettrait de déduire le nombre réel de bactéries mortes induit par le choc de désinfection.

Dans tous les cas, ces résultats démontrent la persistance de *L. pneumophila* dans le réseau-pilote et la nécessité de nouveaux essais permettant de déterminer la physiologie de ces

bactéries et le risque lié à la persistance d'un biofilm potentiellement formé.

V.5 Conclusion

La deuxième partie de ces travaux de thèse concernant la bactérie *L. pneumophila* a permis dans un premier temps de démontrer la capacité de la bactérie à croître de manière adhérente. Ces résultats décrivent notamment la mise au point d'un modèle de formation de biofilm *in vitro* en microplaques. Parmi plusieurs milieux de cultures testés, le milieu retenu (bouillon biofilm supplémenté) permet la formation, après 6 jours d'incubation d'agrégats de cellules adhérents pouvant atteindre 300 µm. La poursuite de ces travaux a démontré que la croissance, dans ces conditions, se produisait à l'intérieur du biofilm, sous forme adhérente et non sous forme planctonique, par opposition à la croissance en milieu riche (BYE). Cette caractéristique importante est la marque de la mise en place d'une structure particulière : le biofilm formé ne résulte pas du simple dépôt de bactéries. Ainsi, les cellules ont probablement des caractéristiques phénotypiques particulières qui pourraient présenter un intérêt pour l'étude des facteurs impliqués dans la formation et la structuration du biofilm, voire l'expression de certains facteurs de virulence.

La suite de ces travaux a permis la réalisation d'études préliminaires concernant la bactéricidie d'un choc thermique vis-à-vis de biofilms à *L. pneumophila*. Aucune bactérie n'a été détectée après traitement de biofilms formés en microplaque, ce qui pourrait indiquer une forte sensibilité de *L. pneumophila* vis-à-vis d'un choc thermique. Cependant, les essais menés en réseau-pilote ont montré que ce traitement n'avait pas ou peu d'effet sur une contamination par *L. pneumophila*. Dans l'ensemble, ces résultats nécessitent des approfondissements visant à déterminer, d'une part, si toutes les bactéries du biofilm formé en microplaques ont été éliminées par la désinfection (bactéries non-cultivables) et d'autre part, si des bactéries cultivables peuvent être détectées dans le réseau-pilote après traitement thermique. Des prélèvements à l'intérieur des canalisations (sous forme de coupons de prélèvements) permettraient également de déterminer si l'inefficacité du choc thermique peut s'expliquer par le maintien de *L. pneumophila* sous forme adhérente. Cette démonstration nécessite la mise en œuvre parallèle de différentes méthodes de caractérisation des populations bactériennes (méthodes de culture, PCR quantitative classique ou avec marquage de viabilité, épifluorescence...) et ce sur les deux modèles.

CHAPITRE VI

Conclusions et perspectives

CONCLUSIONS

La première partie des recherches concernant la bactérie *P. aeruginosa* a permis de vérifier que les techniques d'évaluation du pouvoir bactéricide des désinfectants actuellement utilisées ne sont pas adaptées pour déterminer l'efficacité au sein d'un réseau, et notamment d'un réseau thermal. En effet, ces méthodes ne prennent pas en compte une des propriétés essentielles de la bactérie, à savoir sa capacité à former un biofilm : les résultats *in vitro* obtenus démontrent clairement un abaissement de la sensibilité des bactéries sous forme adhérente, notamment aux traitements chimiques. Le modèle de formation de biofilm en microplaques mis au point au Laboratoire de Microbiologie Industrielle permet, en revanche, de tenir compte de ce paramètre et a révélé l'incapacité de certains traitements préconisés pour la désinfection de réseaux d'EMN à éliminer une population de bactéries adhérentes et cultivables. Toutefois, même si ce modèle semble être un bon outil pour la sélection de conditions actives contre le biofilm de *P. aeruginosa*, il ne permet pas de prédire avec certitude l'efficacité du traitement en réseau. Le traitement thermique à 80 °C, actif *in vitro* sur cellules planctoniques et adhérentes, mais peu efficace en réseau-pilote, en est un bon exemple (maintenance de bactéries viables et cultivables malgré le traitement).

La deuxième partie de cette thèse concerne l'étude de la bactérie *L. pneumophila*. Cette bactérie, responsable de graves problèmes sanitaires, est souvent associée, dans les réseaux d'eau, au biofilm qui se développe sur les canalisations ; d'où la nécessité d'utiliser des modèles prenant en compte le biofilm pour l'évaluation de la bactéricidie des traitements sur *L. pneumophila*.

Les modèles actuellement disponibles décrits dans la littérature impliquent soit des conditions de culture en milieu riche (milieu BYE) favorisant la formation d'un biofilm basé sur la multiplication planctonique, soit l'association de plusieurs micro-organismes (bactériens ou protozoaires notamment) d'origine hydrique dont *L. pneumophila*. Ce dernier modèle varie en fonction des études considérées, en termes de micro-organismes associés et ne peut donc pas être utilisé de manière reproductible pour l'évaluation des traitements.

C'est pourquoi nos recherches ont d'abord consisté en la mise au point d'un modèle *in vitro* de formation de biofilms mono-espèces dans lequel se produit la croissance bactérienne. Ces travaux ont abouti à un protocole basé sur la technique de formation de biofilm à *P. aeruginosa* en microplaques, mais utilisant un milieu (SBB) spécifique à la culture de *L.*

pneumophila en mode sessile. Ce modèle permet la formation, après 6 jours d'incubation de biofilms contenant des agrégats cellulaires atteignant 300 µm de hauteur et a permis de démontrer la sensibilité des biofilms de *L. pneumophila* à un choc thermique à 80 °C *in vitro*.

En revanche, des essais menés sur le réseau-pilote montrent que, malgré l'application de plusieurs chocs thermiques, la bactérie est capable de se maintenir de manière durable dans un réseau d'eau minérale naturelle.

PERSPECTIVES

L'ensemble de ces résultats indique que l'association de plusieurs méthodes d'évaluation est nécessaire pour une meilleure représentation des paramètres pouvant altérer l'efficacité des chocs biocides en réseaux d'eau thermale. Ainsi, même si le biofilm semble jouer un rôle important dans la diminution de la sensibilité bactérienne, d'autres paramètres comme la présence de tartre, de zones de faibles débits ou la composition de l'EMN peuvent aussi réduire l'efficacité des traitements.

Plusieurs pistes peuvent ainsi être proposées pour la poursuite de ces travaux de recherche :

- En premier lieu, de nouveaux essais *in vitro* de bactéricidie sur biofilms doivent être réalisés afin de déduire les concentrations efficaces de désinfectants sur populations cultivables de *P. aeruginosa* et *L. pneumophila*. Ces essais pourront inclure des évaluations de la re-colonisation du milieu après désinfection (par exemple 7 jours après le traitement).
- L'évolution du modèle de formation de biofilms en microplaques tant pour *P. aeruginosa* que pour *L. pneumophila* doit être envisagée afin de mieux comprendre les échecs de désinfection en réseau d'eau minérale naturelle :
 - Différentes techniques de détection des bactéries doivent être utilisées, prenant en compte les bactéries sous forme VBNC, ou les bactéries mortes qui résultent des traitements. Les incohérences des résultats obtenus par culture et qPCR *in situ* concernant la bactérie *L. pneumophila*, ont révélé la nécessité de

coupler plusieurs méthodes de détection afin de mieux comprendre l'état physiologique des bactéries. On peut citer par exemple la qPCR classique, mais aussi la PCR de viabilité, l'épifluorescence par différents marqueurs de viabilité (d'intégrité membranaire ou de respiration).

- Des essais en eau dure ou en EMN, par exemple, permettraient d'analyser l'influence de la formation de dépôts minéraux comme le tartre dans la résistance des biofilms bactériens qui peuvent encore limiter l'accessibilité des bactéries aux biocides ;
 - La visualisation par microscopie confocale avec marquage de viabilité, immédiatement ou non après traitement, apporterait de nouvelles indications sur les bactéries résiduelles et sur la structure biofilm après désinfection. Ces analyses permettrait donc de mieux comprendre les phénomènes de recolonisation qui se produisent au sein des réseaux.
 - L'étude fine des caractéristiques des bactéries formant le biofilms pourrait enfin révéler l'induction de certains facteurs de virulence (système Icm/Dot chez *L. pneumophila* par exemple) et participer à la compréhension du rôle des biofilms dans le caractère infectieux des bactéries. En parallèle, la poursuite de la caractérisation de la matrice du biofilm (par FLBA par exemple) doit être réalisée afin de mieux comprendre la mise en place de cette structure.
- Enfin, de nouveaux essais sur des modèles de réseaux-pilote doivent être effectués afin de compléter les résultats déjà obtenus :
 - D'abord, ces essais devront prendre en compte la mesure du biocide résiduel durant et après les épisodes de désinfection, afin de vérifier que les échecs des traitements constatés n'ont pas pour origine une consommation rapide du biocide, notamment par le biofilm ;
 - L'association de plusieurs techniques de détection (PCR pour *P. aeruginosa*, culture pour *L. pneumophila*, qPCR classique ou de viabilité, épifluorescence, FISH) est également nécessaire, pour préciser l'état physiologique des

bactéries dans le réseau après traitement ;

- Enfin, la détection et la quantification du biofilm formé sur les canalisations du réseau-pilote permettrait de conclure quant à son impact dans la persistance des bactéries dans les réseaux d'EMN. Si la formation d'un biofilm a été envisagée dans le réseau pilote pour expliquer la résistance de *P. aeruginosa* ou *L. pneumophila* à différents traitements, sa présence n'a pas été vérifiée avec certitude. La quantification de ces deux pathogènes opportunistes au sein du biofilm pendant et après les traitements permettrait de faire le parallèle avec les résultats obtenus sur modèle de formation de biofilms en microplaques et donc d'expliquer les phénomènes de recolonisation.

CHAPITRE VII

Bibliographie

Abenheim L.

Arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié relatif au contrôle des sources d'eaux minérales. (2000) **DGdl Santé**.

Abu Kwaik Y., Gao L.Y., Stone B.J., Venkataraman C., Harb O.S.

Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* (1998) **64** (9): 3127-33.

Afnor

(1993). Recherche et dénombrement de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridia*). NF EN 26461-1, ISO 6461-1, AFNOR. **T90-434**.

Afnor

(1999). Dénombrement des micro-organismes revivifiables. Qualité de l'eau. **EN ISO 6222 T 90-401**.

Afnor

(2000). Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux. NF EN ISO 7899-2. **T 90-416**.

Afnor

(2000). Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes. Qualité de l'eau. **T 90-414 NF EN ISO 9308-1**.

Afnor

(2002). Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* par filtration sur membrane. NF EN 12780.

Afnor

(2003). Recherche et dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila*. NF T 90-431.

Afnor

NF EN 1040. Antiseptiques et désinfectants chimiques: essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de base des antiseptiques et désinfectants chimiques. (2006).

Afnor

XP T90-471 - Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). (2006).

Afnor

(2010). Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT - PCR). Qualité de l'eau. **NF T 90-471**.

Alasri A., Roques C., Michel G., Cabassud C., Aptel P.

Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. *Can J Microbiol* (1992)

38 (7): 635-42.

Allegra S., Berger F., Berthelot P., Grattard F., Pozzetto B., Riffard S.

Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. *Appl Environ Microbiol* (2008) **74** (24): 7813-6.

Alleron L., Merlet N., Lacombe C., Frere J.

Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* (2008) **57** (5): 497-502.

Allesen-Holm M., Barken K.B., Yang L., Klausen M., Webb J.S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T.

A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* (2006) **59** (4): 1114-28.

Alt V., Bechert T., Steinrucke P., Wagener M., Seidel P., Dingeldein E., Domann E., Schnettler R.

In vitro testing of antimicrobial activity of bone cement. *Antimicrob Agents Chemother* (2004) **48** (11): 4084-8.

Arnhold J., Panasenko O.M., Schiller J., Vladimirov Yu A., Arnold K.

The action of hypochlorous acid on phosphatidylcholine liposomes in dependence on the content of double bonds. Stoichiometry and NMR analysis. *Chem Phys Lipids* (1995) **78** (1): 55-64.

Atkinson S., Williams P.

Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface* (2009) **6** (40): 959-78.

Barraud N., Hassett D.J., Hwang S.H., Rice S.A., Kjelleberg S., Webb J.S.

Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* (2006) **188** (21): 7344-53.

Bauermeister L.J., Bowers J.W., Townsend J.C., Mckee S.R.

Validating the efficacy of peracetic acid mixture as an antimicrobial in poultry chillers. *J Food Prot* (2008) **71** (6): 1119-22.

Bender T., Karagulle Z., Balint G.P., Gutenbrunner C., Balint P.V., Sukenik S.

Hydrotherapy, balneotherapy, and spa treatment in pain management. *Rheumatol Int* (2005) **25** (3): 220-4.

Benedetto A.V., Millikan L.E.

Mineral water and spas in the United States. *Clin Dermatol* (1996) **14** (6): 583-600.

Berney M., Weilenmann H.U., Ihssen J., Bassin C., Egli T.

Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA, and solar disinfection. *Appl Environ Microbiol* (2006) **72** (4): 2586-93.

Block J.C.

Biofilms in Drinking Water Distribution Systems. *Biofilms - Science and Technology*.(1992).

LF Melo, TF Bott, M Fletcher, B Capdeville, Kluwer Academic Publishers: 469-485.

Boles B.R., Horswill A.R.

Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* (2008) **4** (4): e1000052.

Boles B.R., Thoendel M., Singh P.K.

Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* (2005) **57** (5): 1210-23.

Bollin G.E., Plouffe J.F., Para M.F., Hackman B.

Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl Environ Microbiol* (1985) **50** (5): 1128-31.

Borella P., Guerrieri E., Marchesi I., Bondi M., Messi P.

Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev* (2005) **11**: 355-80.

Bos R., Van Der Mei H.C., Busscher H.J.

Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *Fems Microbiology Reviews* (1999) **23** (2): 179-230.

Bouteleux C., Saby S., Tozza D., Cavard J., Lahoussine V., Hartemann P., Mathieu L.

Escherichia coli behavior in the presence of organic matter released by algae exposed to water treatment chemicals. *Appl Environ Microbiol* (2005) **71** (2): 734-40.

Brenner D.J., Steigerwalt A.G., McDade J.E.

Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Ann Intern Med* (1979) **90** (4): 656-8.

Broxton P., Woodcock P.M., Heatley F., Gilbert P.

Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol* (1984) **57** (1): 115-24.

Bryers J.D., Drummond F.

Local macromolecule diffusion coefficients in structurally non-uniform bacterial biofilms using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Biotechnol Bioeng* (1998) **60** (4): 462-73.

Buswell C.M., Herlihy Y.M., Lawrence L.M., Mcguiggan J.T., Marsh P.D., Keevil C.W., Leach S.A.

Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Appl Environ Microbiol* (1998) **64** (2): 733-41.

Byrd M.S., Sadovskaya I., Vinogradov E., Lu H., Sprinkle A.B., Richardson S.H., Ma L., Ralston B., Parsek M.R., Anderson E.M., Lam J.S., Wozniak D.J.

Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS

production. *Mol Microbiol* (2009) **73** (4): 622-38.

Byrne B., Swanson M.S.

Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun* (1998) **66** (7): 3029-34.

Caiazza N.C., Merritt J.H., Brothers K.M., O'toole G.A.

Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* (2007) **189** (9): 3603-12.

Campanac C., Pineau L., Payard A., Baziard-Mouysset G., Roques C.

Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* (2002) **46** (5): 1469-74.

Cappelli G., Riccardi M., Perrone S., Bondi M., Ligabue G., Albertazzi A.

Water treatment and monitor disinfection. *Hemodial Int* (2006) **10 Suppl 1**: S13-8.

Cappelli G., Sereni L., Scialoja M.G., Morselli M., Perrone S., Ciuffreda A., Bellesia M., Inguaggiato P., Albertazzi A., Tetta C.

Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. *Nephrol Dial Transplant* (2003) **18** (10): 2105-11.

Cargill K.L., Pyle B.H., Sauer R.L., Mcfeters G.A.

Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila*. *Can J Microbiol* (1992) **38** (5): 423-9.

Carvalho F.R., Nastasi F.R., Gamba R.C., Foronda A.S., Pellizari V.H.

Occurrence and diversity of Legionellaceae in polar lakes of the Antarctic peninsula. *Curr Microbiol* (2008) **57** (4): 294-300.

Cattoir V.

[Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol Biol (Paris)* (2004) **52** (10): 607-16.

Chapman M.R., Robinson L.S., Pinkner J.S., Roth R., Heuser J., Hammar M., Normark S., Hultgren S.J.

Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* (2002) **295** (5556): 851-5.

Chaw K.C., Manimaran M., Tay F.E.

Role of silver ions in destabilization of intermolecular adhesion forces measured by atomic force microscopy in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* (2005) **49** (12): 4853-9.

Chiaraviglio L., Brown D.A., Kirby J.E.

Infection of cultured human endothelial cells by *Legionella pneumophila*. *PLoS ONE* (2008) **3** (4): e2012.

Chien M., Morozova I., Shi S., Sheng H., Chen J., Gomez S.M., Asamani G., Hill K., Nuara J., Feder M., Rineer J., Greenberg J.J., Steshenko V., Park S.H., Zhao B.,

Teplitskaya E., Edwards J.R., Pampou S., Georghiou A., Chou I.C., Iannuccilli W., Ulz M.E., Kim D.H., Geringer-Sameth A., Goldsberry C., Morozov P., Fischer S.G., Segal G., Qu X., Rzhetsky A., Zhang P., Cayanis E., De Jong P.J., Ju J., Kalachikov S., Shuman H.A., Russo J.J.

The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* (2004) **305** (5692): 1966-8.

Cneth.

(2005). "<http://www.france-thermale.org>."

Cneth

(2008). Guide des Bonnes Pratiques Thermales

Cochran W.L., Mcfeters G.A., Stewart P.S.

Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol* (2000) **88** (1): 22-30.

Coers J., Monahan C., Roy C.R.

Modulation of phagosome biogenesis by *Legionella pneumophila* creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nat Cell Biol* (1999) **1** (7): 451-3.

Cooper I.R., Hanlon G.W.

Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *J Hosp Infect* (2009) **74** (2): 152-9.

Costa J., Da Costa M.S., Verissimo A.

Colonization of a therapeutic spa with *Legionella* spp: a public health issue. *Res Microbiol* (2010) **161** (1): 18-25.

Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M.

Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* (1995) **49**: 711-45.

Cshpf, Dgs

Recommandations relatives à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux. (1999) **MdlEedl Solidarité**.

Csp

Article L1322-2. Loi 2004-806. (2004).

Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P.

The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* (1998) **280** (5361): 295-8.

De Beer D., Srinivasan R., Stewart P.S.

Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* (1994) **60** (12): 4339-44.

De Buck E., Anne J., Lammertyn E.

The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology* (2007) **153** (Pt 12): 3948-53.

Debroy S., Dao J., Soderberg M., Rossier O., Cianciotto N.P.

Legionella pneumophila type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) **103** (50): 19146-51.

Declerck P.

Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* (2009).

Declerck P., Behets J., Margineanu A., Van Hoef V., De Keersmaecker B., Ollevier F.

Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol Res* (2009) **164** (6): 593-603.

Declerck P., Behets J., Van Hoef V., Ollevier F.

Replication of *Legionella pneumophila* in floating biofilms. *Curr Microbiol* (2007) **55** (5): 435-40.

Deloge-Abarkan M., Ha T.L., Robine E., Zmirou-Navier D., Mathieu L.

Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent in situ hybridization (FISH). *J Environ Monit* (2007) **9** (1): 91-7.

Dequeiroz G.A., Day D.F.

Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *J Appl Microbiol* (2007) **103** (4): 794-802.

Dgs

Circulaire DGS/VS 4 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale naturelle dans les établissements thermaux. MESP0030267C. (2000).

Dgs

(2005). La qualité microbiologique des eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques en milieu thermal au cours de la saison thermale 2001. Paris.

Donlan R.M.

Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* (2002) **8** (9): 881-90.

Dusserre E., Ginevra C., Hallier-Soulier S., Vandenesch F., Festoc G., Etienne J., Jarraud S., Molmeret M.

A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable legionellae that can recover their cultivability. *Appl Environ Microbiol* (2008) **74** (15): 4817-24.

Elkins J.G., Hassett D.J., Stewart P.S., Schweizer H.P., Mcdermott T.R.

Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol* (1999) **65** (10): 4594-600.

Engel J., Balachandran P.

Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* (2009) **12**

(1): 61-6.

Faille C., Jullien C., Fontaine F., Bellon-Fontaine M.N., Slomianny C., Benezech T.

Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can J Microbiol* (2002) **48** (8): 728-38.

Farhat M., Trouilhe M.C., Briand E., Moletta-Denat M., Robine E., Frere J.

Development of a pilot-scale 1 for Legionella elimination in biofilm in hot water network: heat shock treatment evaluation. *J Appl Microbiol* (2010) **108** (3): 1073-82.

Faulkner G., Garduno R.A.

Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* (2002) **184** (24): 7025-41.

Feeley J.C., Gibson R.J., Gorman G.W., Langford N.C., Rasheed J.K., Mackel D.C., Baine W.B.

Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* (1979) **10** (4): 437-41.

Ferhat M., Atlan D., Vianney A., Lazzaroni J.C., Doublet P., Gilbert C.

The TolC protein of *Legionella pneumophila* plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion. *PLoS ONE* (2009) **4** (11): e7732.

Fernandez-Moreira E., Helbig J.H., Swanson M.S.

Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infect Immun* (2006) **74** (6): 3285-95.

Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E.

Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* (2002) **15** (3): 506-26.

Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E.

Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* (2002) **15** (3): 506-26.

Fleurette J., Freney J., Reverdy M.

Antisepsie et désinfection. (1995). Paris.

Fliermans C.B., Cherry W.B., Orrison L.H., Smith S.J., Tison D.L., Pope D.H.

Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* (1981) **41** (1): 9-16.

Fliermans C.B., Cherry W.B., Orrison L.H., Smith S.J., Tison D.L., Pope D.H.

Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* (1981) **41** (1): 9-16.

Ganeshnarayan K., Shah S.M., Libera M.R., Santostefano A., Kaplan J.B.

Poly-N-acetylglucosamine matrix polysaccharide impedes fluid convection and transport of the cationic surfactant cetylpyridinium chloride through bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* (2009) **75** (5): 1308-14.

Garduno R.A., Faulkner G., Trevors M.A., Vats N., Hoffman P.S.

Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* (1998) **180** (3): 505-13.

Garduno R.A., Garduno E., Hiltz M., Hoffman P.S.

Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun* (2002) **70** (11): 6273-83.

Giao M.S., Wilks S., Azevedo N.F., Vieira M.J., Keevil C.W.

Incorporation of natural uncultivable *Legionella pneumophila* into potable water biofilms provides a protective niche against chlorination stress. *Biofouling* (2009) **25** (4): 335-41.

Giaouris E., Chorianopoulos N., Nychas G.J.

Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *J Food Prot* (2005) **68** (10): 2149-54.

Gilbert P., Das J.R., Jones M.V., Allison D.G.

Assessment of resistance towards biocides following the attachment of micro-organisms to, and growth on, surfaces. *J Appl Microbiol* (2001) **91** (2): 248-54.

Gilbert P., Moore L.E.

Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* (2005) **99** (4): 703-15.

Glynn A.A., O'donnell S.T., Molony D.C., Sheehan E., McCormack D.J., O'gara J.P.

Hydrogen peroxide induced repression of *icaADBC* transcription and biofilm development in *Staphylococcus epidermidis*. *J Orthop Res* (2009) **27** (5): 627-30.

Golovlev E.L.

[General and molecular ecology of *Legionella*]. *Mikrobiologiya* (2000) **69** (1): 5-12.

Greub G., Raoult D.

Morphology of *Legionella pneumophila* according to their location within *Hartmanella vermiformis*. *Res Microbiol* (2003) **154** (9): 619-21.

Gruenberg J., Van Der Goot F.G.

Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2006) **7** (7): 495-504.

Guerrieri E., Bondi M., Sabia C., De Niederhausern S., Borella P., Messi P.

Effect of bacterial interference on biofilm development by *Legionella pneumophila*. *Curr Microbiol* (2008) **57** (6): 532-6.

Hagele S., Kohler R., Merkert H., Schleicher M., Hacker J., Steinert M.

Dictyostelium discoideum: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell Microbiol* (2000) **2** (2): 165-71.

Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.

Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* (2004) **2** (2): 95-108.

Hancock R.E., Speert D.P.

Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat* (2000) **3** (4): 247-255.

Hann S.K.

Mineral water and spas in Korea. *Clin Dermatol* (1996) **14** (6): 633-5.

Harb O.S., Gao L.Y., Abu Kwaik Y.

From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ Microbiol* (2000) **2** (3): 251-65.

Harrison T.G., Taylor A.G.

Timing of seroconversion in Legionnaires' disease. *Lancet* (1988) **2** (8614): 795.

Helbig J.H., Kurtz J.B., Pastoris M.C., Pelaz C., Luck P.C.

Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J Clin Microbiol* (1997) **35** (11): 2841-5.

Heller R., Holler C., Sussmuth R., Gundermann K.O.

Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Lett Appl Microbiol* (1998) **26** (1): 64-8.

Hendrickson E.L., Plotnikova J., Mahajan-Miklos S., Rahme L.G., Ausubel F.M.

Differential roles of the *Pseudomonas aeruginosa* PA14 rpoN gene in pathogenicity in plants, nematodes, insects, and mice. *J Bacteriol* (2001) **183** (24): 7126-34.

Hermansson M.

The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* (1999) **14** (1-4): 105-119.

Hickey E.K., Cianciotto N.P.

An iron- and fur-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases. *Infect Immun* (1997) **65** (1): 133-43.

Hindre T., Bruggemann H., Buchrieser C., Hechard Y.

Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology* (2008) **154** (Pt 1): 30-41.

Hope C.K., Wilson M.

Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* (2004) **48** (5): 1461-8.

Houssin D.

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. (2010) **DGdl Santé**.

Hsu B.M., Chen C.H., Wan M.T., Cheng H.W.

Legionella prevalence in hot spring recreation areas of Taiwan. *Water Res* (2006) **40** (17): 3267-73.

Hwang M.G., Katayama H., Ohgaki S.

Inactivation of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa*: evaluation of the bactericidal ability of silver cations. *Water Res* (2007) **41** (18): 4097-104.

Inoue T., Inoue S., Kubota K.

Bactericidal activity of manganese and iodide ions against *Staphylococcus aureus*: a possible treatment for acute atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* (1999) **79** (5): 360-2.

Izano E.A., Amarante M.A., Kher W.B., Kaplan J.B.

Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* (2008) **74** (2): 470-6.

Jarraud S., Reyrolle M., Étienne J.

Legionella et légionelloses. *Actualités Permanentes en Bactériologie Clinique*.(2002). ESKA.

Jorgensen F., Bally M., Chapon-Herve V., Michel G., Lazdunski A., Williams P., Stewart G.S.

RpoS-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* (1999) **145** (Pt 4): 835-44.

Jucker B.A., Harms H., Zehnder A.J.

Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J Bacteriol* (1996) **178** (18): 5472-9.

Kayser W.V., Hickman K.C., Bond W.W., Favero M.S., Carson L.A.

Bacteriological evaluation of an ultra-pure water-distilling system. *Appl Microbiol* (1975) **30** (4): 704-6.

Kerr K.G., Snelling A.M.

Pseudomonas aeruginosa: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* (2009) **73** (4): 338-44.

Khalilzadeh P., Lajoie B., El Hage S., Furiga A., Baziard G., Bergé M., Roques C.

Growth inhibition of adherent *Pseudomonas aeruginosa* by a N-butanoyl-homoserine lactone analog. *Canadian Journal of Microbiology* (2010) **56**: 1-9.

Kim B.R., Anderson J.E., Mueller S.A., Gaines W.A., Kendall A.M.

Literature review--efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res* (2002) **36** (18): 4433-44.

Kim J., Hahn J.S., Franklin M.J., Stewart P.S., Yoon J.

Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to

antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* (2009) **63** (1): 129-35.

Kipnis E., Sawa T., Wiener-Kronish J.

Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* (2006) **36** (2): 78-91.

Klausen M., Heydorn A., Ragas P., Lambertsen L., Aaes-Jorgensen A., Molin S., Tolker-Nielsen T.

Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* (2003) **48** (6): 1511-24.

Klont R.R., Rijs A.J., Warris A., Sturm P.D., Melchers W.J., Verweij P.E.

Legionella pneumophila in commercial bottled mineral water. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2006) **47** (1): 42-4.

Knezevic P., Petrovic O.

A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J Microbiol Methods* (2008) **74** (2-3): 114-8.

Knox W.E., Stumpf P.K., Et Al.

The inhibition of sulfhydryl enzymes as the basis of the bactericidal action of chlorine. *J Bacteriol* (1948) **55** (4): 451-8.

Konishi T., Yamashiro T., Koide M., Nishizono A.

Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila* biofilm determined by precise temperature gradient incubator. *J Biosci Bioeng* (2006) **101** (6): 478-84.

Kooistra O., Luneberg E., Knirel Y.A., Frosch M., Zahringer U.

N-Methylation in polylegionaminic acid is associated with the phase-variable epitope of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Identification of 5-(N,N-dimethylacetimidoyl)amino and 5-acetimidoyl(N-methyl)amino-7-acetamido-3,5,7,9-tetradeoxyon-2-ulosonic acid in the O-chain polysaccharide. *Eur J Biochem* (2002) **269** (2): 560-72.

Krebs F.C., Miller S.R., Ferguson M.L., Labib M., Rando R.F., Wigdahl B.

Polybiguanides, particularly polyethylene hexamethylene biguanide, have activity against human immunodeficiency virus type 1. *Biomed Pharmacother* (2005) **59** (8): 438-45.

Kuiper M.W., Wullings B.A., Akkermans A.D., Beumer R.R., Van Der Kooij D.

Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl Environ Microbiol* (2004) **70** (11): 6826-33.

Kusnetsov J.M., Tulkki A.I., Ahonen H.E., Martikainen P.J.

Efficacy of three prevention strategies against legionella in cooling water systems. *J Appl Microbiol* (1997) **82** (6): 763-8.

Lasheras A., Boulestreau H., Rogues A.M., Ohayon-Courtes C., Labadie J.C., Gachie J.P.

Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and

proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am J Infect Control* (2006) **34** (8): 520-5.

Latasa C., Solano C., Penades J.R., Lasa I.

Biofilm-associated proteins. *C R Biol* (2006) **329** (11): 849-57.

Lau H.Y., Ashbolt N.J.

The role of biofilms and protozoa in Legionella pathogenesis: implications for drinking water. *J Appl Microbiol* (2009) **107** (2): 368-78.

Lawrence J.R., Swerhone G.D., Kuhlicke U., Neu T.R.

In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Can J Microbiol* (2007) **53** (3): 450-8.

Lechevallier M.W., Babcock T.M., Lee R.G.

Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl Environ Microbiol* (1987) **53** (12): 2714-24.

Leclerc H., Moreau A.

Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol Rev* (2002) **26** (2): 207-22.

Leclerc H., Moreau A.

Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol Rev* (2002) **26** (2): 207-22.

Lee V.T., Matewish J.M., Kessler J.L., Hyodo M., Hayakawa Y., Lory S.

A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol* (2007) **65** (6): 1474-84.

Legnani P., Leoni E., Rapuano S., Turin D., Valenti C.

Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. *Int J Food Microbiol* (1999) **53** (2-3): 153-8.

Leoni E., Sacchetti R., Zanetti F., Legnani P.P.

Control of *Legionella pneumophila* contamination in a respiratory hydrotherapy system with sulfurous spa water. *Infect Control Hosp Epidemiol* (2006) **27** (7): 716-21.

Liaquat I., Sabri A.N.

Effect of biocides on biofilm bacteria from dental unit water lines. *Curr Microbiol* (2008) **56** (6): 619-24.

Liles M.R., Viswanathan V.K., Cianciotto N.P.

Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect Immun* (1998) **66** (4): 1776-82.

Liu Z., Stout J.E., Boldin M., Rugh J., Diven W.F., Yu V.L.

Intermittent use of copper-silver ionization for *Legionella* control in water distribution systems: a potential option in buildings housing individuals at low risk of infection. *Clin Infect Dis* (1998) **26** (1): 138-40.

Lu T.K., Collins J.J.

Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) **104** (27): 11197-202.

Lucas C.E., Brown E., Fields B.S.

Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention. *Microbiology* (2006) **152** (Pt 12): 3569-73.

Luneberg E., Mayer B., Daryab N., Kooistra O., Zahringer U., Rohde M., Swanson J., Frosch M.

Chromosomal insertion and excision of a 30 kb unstable genetic element is responsible for phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* (2001) **39** (5): 1259-71.

Luneberg E., Zahringer U., Knirel Y.A., Steinmann D., Hartmann M., Steinmetz I., Rohde M., Kohl J., Frosch M.

Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *legionella pneumophila*. *J Exp Med* (1998) **188** (1): 49-60.

Ma L., Conover M., Lu H., Parsek M.R., Bayles K., Wozniak D.J.

Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* (2009) **5** (3): e1000354.

Ma'or Z., Henis Y., Alon Y., Orlov E., Sorensen K.B., Oren A.

Antimicrobial properties of Dead Sea black mineral mud. *Int J Dermatol* (2006) **45** (5): 504-11.

Maeyama R., Mizunoe Y., Anderson J.M., Tanaka M., Matsuda T.

Confocal imaging of biofilm formation process using fluoroprobed *Escherichia coli* and fluoro-stained exopolysaccharide. *J Biomed Mater Res A* (2004) **70** (2): 274-82.

Mah T.F., O'toole G.A.

Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* (2001) **9** (1): 34-9.

Maillard J.Y.

Bacterial target sites for biocide action. *J Appl Microbiol* (2002) **92** Suppl: 16S-27S.

Mampel J., Spirig T., Weber S.S., Haagensen J.A., Molin S., Hilbi H.

Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Appl Environ Microbiol* (2006) **72** (4): 2885-95.

Mann E.E., Rice K.C., Boles B.R., Endres J.L., Ranjit D., Chandramohan L., Tsang L.H., Smeltzer M.S., Horswill A.R., Bayles K.W.

Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One* (2009) **4** (6): e5822.

Manuel C.M., Nunes O.C., Melo L.F.

Unsteady state flow and stagnation in distribution systems affect the biological stability of drinking water. *Biofouling* (2009) **26** (2): 129-39.

Marciano-Cabral F., Cabral G.

Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* (2003) **16** (2): 273-307.

Massol-Deya A.A., Whallon J., Hickey R.F., Tiedje J.M.

Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl Environ Microbiol* (1995) **61** (2): 769-77.

Matz H., Orion E., Wolf R.

Balneotherapy in dermatology. *Dermatol Ther* (2003) **16** (2): 132-40.

Mcdade J.E., Shepard C.C., Fraser D.W., Tsai T.R., Redus M.A., Dowdle W.R.

Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* (1977) **297** (22): 1197-203.

Mcdonnell G., Russell A.D.

Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* (1999) **12** (1): 147-79.

Mckenna S.M., Davies K.J.

The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochem J* (1988) **254** (3): 685-92.

Merino S., Shaw J.G., Tomas J.M.

Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiol Lett* (2006) **263** (2): 127-35.

Miyake M., Fukui T., Imai Y.

Differences in protein synthesis between wild type and intracellular growth-deficient strains of *Legionella pneumophila* in U937 and *Acanthamoeba polyphaga*. *Microb Pathog* (2006) **40** (4): 161-70.

Molofsky A.B., Swanson M.S.

Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* (2004) **53** (1): 29-40.

Moore L.E., Ledder R.G., Gilbert P., Mcbain A.J.

In vitro study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. *Appl Environ Microbiol* (2008) **74** (15): 4825-34.

Moore M.R., Pryor M., Fields B., Lucas C., Phelan M., Besser R.E.

Introduction of monochloramine into a municipal water system: impact on colonization of buildings by *Legionella* spp. *Appl Environ Microbiol* (2006) **72** (1): 378-83.

Moritz M.M., Flemming H.C., Wingender J.

Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *Int J Hyg Environ Health*.

Muller G., Kramer A.

Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J Antimicrob Chemother* (2008) **61** (6): 1281-7.

Muraca P., Stout J.E., Yu V.L.

Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing *Legionella pneumophila* within a model plumbing system. *Appl Environ Microbiol* (1987) **53** (2): 447-53.

Murga R., Forster T.S., Brown E., Pruckler J.M., Fields B.S., Donlan R.M.

Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* (2001) **147** (Pt 11): 3121-6.

Muscarella L.F.

Contribution of tap water and environmental surfaces to nosocomial transmission of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Control Hosp Epidemiol* (2004) **25** (4): 342-5.

Nakao R., Senpuku H., Watanabe H.

Porphyromonas gingivalis galE is involved in lipopolysaccharide O-antigen synthesis and biofilm formation. *Infect Immun* (2006) **74** (11): 6145-53.

Neil K., Berkelman R.

Increasing incidence of legionellosis in the United States, 1990-2005: changing epidemiologic trends. *Clin Infect Dis* (2008) **47** (5): 591-9.

Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiss A., Reidl J.

Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El tor galU and galE mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect Immun* (2001) **69** (1): 435-45.

Neu T., Swerhone G.D., Lawrence J.R.

Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology* (2001) **147** (Pt 2): 299-313.

Norton C.D., Lechevallier M.W.

A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Appl Environ Microbiol* (2000) **66** (1): 268-76.

O'toole G.A., Kolter R.

Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* (1998) **30** (2): 295-304.

Oakley J.D., Taylor K.G., Doyle R.J.

Trypsin-susceptible cell surface characteristics of *Streptococcus sanguis*. *Can J Microbiol* (1985) **31** (12): 1103-7.

Ohno A., Kato N., Yamada K., Yamaguchi K.

Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl Environ Microbiol* (2003) **69** (5): 2540-7.

Oie S., Kiyonaga H., Matsuzaka Y., Maeda K., Masuda Y., Tasaka K., Aritomi S., Yamashita A., Kamiya A.

Microbial contamination of fruit and vegetables and their disinfection. *Biol Pharm Bull* (2008) **31** (10): 1902-5.

Orlando P., Cristina M.L., Dallera M., Ottria G., Vitale A., Badolati G.

Surface disinfection: evaluation of the efficacy of a nebulization system spraying hydrogen peroxide. *J Prev Med Hyg* (2008) **49** (3): 116-9.

Ott M., Messner P., Heesemann J., Marre R., Hacker J.

Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *J Gen Microbiol* (1991) **137** (8): 1955-61.

Palmer J., Flint S., Brooks J.

Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* (2007) **34** (9): 577-88.

Parsek M.R., Tolker-Nielsen T.

Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Opin Microbiol* (2008) **11** (6): 560-6.

Patel J.D., Ebert M., Stokes K., Ward R., Anderson J.M.

Inhibition of bacterial and leukocyte adhesion under shear stress conditions by material surface chemistry. *J Biomater Sci Polym Ed* (2003) **14** (3): 279-95.

Pearce M.M., Cianciotto N.P.

Legionella pneumophila secretes an endoglucanase that belongs to the family-5 of glycosyl hydrolases and is dependent upon type II secretion. *FEMS Microbiol Lett* (2009) **300** (2): 256-64.

Pécastaings S., Bergé M., Dubourg K.M., Roques C.

Sessile *Legionella pneumophila* is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms. *Biofouling* (2010) **26** (7): 809-819.

Pedro-Botet L., Yu V.L.

Legionella: macrolides or quinolones? *Clin Microbiol Infect* (2006) **12 Suppl 3**: 25-30.

Peeters E., Nelis H.J., Coenye T.

Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* (2008) **72** (2): 157-65.

Peeters E., Nelis H.J., Coenye T.

Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *J Hosp Infect* (2008) **70** (4): 361-8.

Perdersen K.

Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Water Research* (1990) **24** (2): 239-243.

Piao Z., Sze C.C., Barysheva O., Iida K., Yoshida S.

Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* (2006) **72** (2): 1613-22.

Pineau L., Roques C., Luc J., Michel G.

Automatic washer disinfectors for flexible endoscopes: a new evaluation process. *Endoscopy* (1997) **29** (5): 372-9.

Pitts B., Hamilton M.A., Zilver N., Stewart P.S.

A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Methods* (2003) **54** (2): 269-76.

Popoff G.

Les bonnes pratiques d'exploitation des eaux minérales dans un établissement thermal. *Presse Thermale et Climatique* (1992) **129** (3): 192-201.

Pöttering H.G., Füle S.

Directive relative à l'exploitation et à la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles. 2009/54/CE. (2009) **Parlement, Européen, Conseil, de, l'Union, Européenne**.

Pratt L.A., Kolter R.

Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* (1998) **30** (2): 285-93.

Presterl E., Suchomel M., Eder M., Reichmann S., Lassnigg A., Graninger W., Rotter M.

Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* (2007) **60** (2): 417-20.

Prutz W.A.

Interactions of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates. *Arch Biochem Biophys* (1998) **349** (1): 183-91.

Queneau P., Boulangé M., Françon A., Graber-Duvernay B., Laroche C., Oudot J., Roques C.

Médecine thermale: Faits et preuves, bonnes indications, bonnes pratiques. (2000). Paris.

Rankin S., Li Z., Isberg R.R.

Macrophage-induced genes of *Legionella pneumophila*: protection from reactive intermediates and solute imbalance during intracellular growth. *Infect Immun* (2002) **70** (7): 3637-48.

Raya A., Sodagari M., Pinzon N.M., He X., Zhang Newby B.M., Ju L.K.

Effects of rhamnolipids and shear on initial attachment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in glass flow chambers. *Environ Sci Pollut Res Int* (2010).

Reasoner D.J., Geldreich E.E.

A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* (1985) **49** (1): 1-7.

Reese S., Guggenheim B.

A novel TEM contrasting technique for extracellular polysaccharides in in vitro biofilms. *Microsc Res Tech* (2007) **70** (9): 816-22.

Ristroph J.D., Hedlund K.W., Allen R.G.

Liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* (1980) **11** (1): 19-21.

Rocard M., Bérégovoy P., Arpaillange P., Fauroux R., Nallet H., Évin C., Néiértz V.

Décret n° 89-369 du 9 juin 1989 relatif aux eaux minérales naturelles et aux eaux potables préemballées. 89-369. (1989).

Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V., Keevil C.W.

Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems. *Appl Environ Microbiol* (1994) **60** (6): 1842-1851.

Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V., Keevil C.W.

Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl Environ Microbiol* (1994) **60** (5): 1585-92.

Rogers J., Dowsett A.B., Keevil C.W.

A paint incorporating silver to control mixed biofilms containing *Legionella pneumophila*. *J Ind Microbiol* (1995) **15** (4): 377-83.

Rogers J., Keevil C.W.

Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl Environ Microbiol* (1992) **58** (7): 2326-30.

Routh H.B., Bhowmik K.R., Parish L.C., Witkowski J.A.

Balneology, mineral water, and spas in historical perspective. *Clin Dermatol* (1996) **14** (6): 551-4.

Rowbotham T.J.

Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* (1980) **33** (12): 1179-83.

Ryder C., Byrd M., Wozniak D.J.

Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* (2007) **10** (6): 644-8.

Ryu J.H., Beuchat L.R.

Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol* (2005) **71** (1): 247-54.

Saby S., Vidal A., Suty H.

Resistance of *Legionella* to disinfection in hot water distribution systems. *Water Sci Technol* (2005) **52** (8): 15-28.

Salami A., Dellepiane M., Crippa B., Mora F., Guastini L., Jankowska B., Mora R.
Sulphurous water inhalations in the prophylaxis of recurrent upper respiratory tract infections.
Int J Pediatr Otorhinolaryngol (2008) **72** (11): 1717-22.

Saldana Z., Xicohtencatl-Cortes J., Avelino F., Phillips A.D., Kaper J.B., Puente J.L., Giron J.A.
Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli.
Environ Microbiol (2009) **11** (4): 992-1006.

Samrakandi M.M.
(1996). Biofilms bactériens : croissance, facteurs de résistance au chlore et état de stress
Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Microbiologie Industrielle. Toulouse, Université Paul Sabatier: 182.

Samrakandi M.M., Cirillo S.L., Ridenour D.A., Bermudez L.E., Cirillo J.D.
Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains. *J Clin Microbiol* (2002) **40** (4): 1352-62.

Samrakandi M.M., Roques C., Michel G.
Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. *Can J Microbiol* (1997) **43** (8): 751-8.

Sandberg M., Maattanen A., Peltonen J., Vuorela P.M., Fallarero A.
Automating a 96-well microtitre plate model for *Staphylococcus aureus* biofilms: an approach to screening of natural antimicrobial compounds. *Int J Antimicrob Agents* (2008) **32** (3): 233-40.

Santé D.G.D.L.
Circulaire DGS/VS 4 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale naturelle dans les établissements thermaux. MESP0030267C. (2000).

Santodomingo-Rubido J.
The comparative clinical performance of a new polyhexamethylene biguanide- vs a polyquad-based contact lens care regime with two silicone hydrogel contact lenses. *Ophthalmic Physiol Opt* (2007) **27** (2): 168-73.

Sauer K., Camper A.K.
Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol* (2001) **183** (22): 6579-89.

Segal G., Feldman M., Zusman T.
The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *Fems Microbiology Reviews* (2005) **29** (1): 65-81.

Servais P., Laurent P., Randon G.
Comparison of the bacterial dynamics in various French distribution systems. *J Water SRT - Aqua* (1995) **44** (1): 10-17.

Shohdy N., Efe J.A., Emr S.D., Shuman H.A.

Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) **102** (13): 4866-71.

Simoes L.C., Simoes M., Oliveira R., Vieira M.J.

Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. *J Basic Microbiol* (2007) **47** (2): 174-83.

Soderberg M.A., Cianciotto N.P.

A *Legionella pneumophila* peptidyl-prolyl cis-trans isomerase present in culture supernatants is necessary for optimal growth at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* (2008) **74** (5): 1634-8.

Solidarités M.D.L.S.E.D.

Arrêté du 27 février 2007 relatif aux traitements de l'eau minérale naturelle utilisée à des fins thérapeutiques dans les établissements thermaux. SANP0721196A. (2007).

Solidarités M.D.L.S.E.D.

Arrêté du 5 mars 2007 relatif à la constitution du dossier de demande d'autorisation d'exploiter une source d'eau minérale naturelle pour le conditionnement, l'utilisation à des fins thérapeutiques dans un établissement thermal ou la distribution en buvette publique. SANP0721197A. (2007).

Spinks A.T., Dunstan R.H., Harrison T., Coombes P., Kuczera G.

Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. *Water Res* (2006) **40** (6): 1326-32.

Steinert M., Emody L., Amann R., Hacker J.

Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* (1997) **63** (5): 2047-53.

Steinert M., Hentschel U., Hacker J.

Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* (2002) **26** (2): 149-62.

Stewart P.S., Roe F., Rayner J., Elkins J.G., Lewandowski Z., Ochsner U.A., Hassett D.J.

Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* (2000) **66** (2): 836-8.

Stolhaug A., Bergh K.

Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by mip sequencing. *Appl Environ Microbiol* (2006) **72** (9): 6394-8.

Stone B.J., Abu Kwaik Y.

Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* (1998) **66** (4): 1768-75.

Stoodley P., Debeer D., Lewandowski Z.

Liquid Flow in Biofilm Systems. *Appl Environ Microbiol* (1994) **60** (8): 2711-2716.

Storey M.V., Langmark J., Ashbolt N.J., Stenstrom T.A.

The fate of legionellae within distribution pipe biofilms: measurement of their persistence, inactivation and detachment. *Water Sci Technol* (2004) **49** (11-12): 269-75.

Storey M.V., Winiiecka-Krusnell J., Ashbolt N.J., Stenstrom T.A.

The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant Acanthamoebae and Legionellae. *Scand J Infect Dis* (2004) **36** (9): 656-62.

Stout J.E., Yu V.L., Best M.G.

Ecology of Legionella pneumophila within water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* (1985) **49** (1): 221-8.

Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E., Lory S., Olson M.V.

Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* (2000) **406** (6799): 959-64.

Strathmann M., Wingender J., Flemming H.C.

Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* (2002) **50** (3): 237-48.

Su H.P., Tseng L.R., Tzeng S.C., Chou C.Y., Chung T.C.

A legionellosis case due to contaminated spa water and confirmed by genomic identification in Taiwan. *Microbiol Immunol* (2006) **50** (5): 371-7.

Sukthana Y., Lekkla A., Sutthikornchai C., Wanapongse P., Vejjajiva A., Bovornkitti S.

Spa, springs and safety. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* (2005) **36** Suppl 4: 10-6.

Sule P., Wadhawan T., Carr N.J., Horne S.M., Wolfe A.J., Pruss B.M.

A combination of assays reveals biomass differences in biofilms formed by *Escherichia coli* mutants. *Lett Appl Microbiol* (2009) **49** (3): 299-304.

Syndicat National Des MéDecins Des Stations Thermales M.E.C.D.F.

Guide des Bonnes Pratiques Thermales. *Presse Thermale et Climatique* (2004) **141**: 101-143.

Taylor M., Ross K., Bentham R.

Legionella, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol* (2009) **58** (3): 538-47.

Temmerman R., Vervaeren H., Nosedá B., Boon N., Verstraete W.

Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* (2006) **72** (6): 4323-8.

Terrier C., Hansen W., Renaud F., Freney J.

Pseudomonas. *Manuel de Bactériologie Clinique*.(1992). Elsevier. **2**: 941-952.

Thomas V., Bouchez T., Nicolas V., Robert S., Loret J.F., Levi Y.

Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. *J Appl Microbiol* (2004) **97** (5): 950-63.

Tison D.L., Pope D.H., Cherry W.B., Fliermans C.B.

Growth of Legionella pneumophila in association with blue-green algae (cyanobacteria). *Appl Environ Microbiol* (1980) **39** (2): 456-9.

Tossa P., Deloge-Abarkan M., Zmirou-Navier D., Hartemann P., Mathieu L.

Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health* (2006) **6**: 112.

Tote K., Vanden Berghe D., Levecque S., Benere E., Maes L., Cos P.

Evaluation of hydrogen peroxide-based disinfectants in a new resazurin microplate method for rapid efficacy testing of biocides. *J Appl Microbiol* (2009) **107** (2): 606-15.

Trautmann M., Lepper P.M., Haller M.

Ecology of Pseudomonas aeruginosa in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* (2005) **33** (5 Suppl 1): S41-9.

Van Dellen K.L., Houot L., Watnick P.I.

Genetic analysis of *Vibrio cholerae* monolayer formation reveals a key role for DeltaPsi in the transition to permanent attachment. *J Bacteriol* (2008) **190** (24): 8185-96.

Van Der Kooij D., Veenendaal H.R., Scheffer W.J.

Biofilm formation and multiplication of Legionella in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res* (2005) **39** (13): 2789-98.

Van Heeckeren A.M., Schlachter M.D.

Murine models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Lab Anim* (2002) **36** (3): 291-312.

Van Tubergen A., Hidding A.

Spa and exercise treatment in ankylosing spondylitis: fact or fancy? *Best Pract Res Clin Rheumatol* (2002) **16** (4): 653-66.

Vanhaecke E., Remon J.P., Moors M., Raes F., De Rudder D., Van Peteghem A.

Kinetics of Pseudomonas aeruginosa adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol* (1990) **56** (3): 788-95.

Vanoss C.J., Good R.J., Chaudhury M.K.

The Role of van der Waals Forces and Hydrogen Bonds in "Hydrophobic Interactions" between Biopolymers and Low Energy Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* (1986) **111** (2): 378-390.

Virto R., Manas P., Alvarez I., Condon S., Raso J.

Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. *Appl Environ Microbiol* (2005) **71** (9): 5022-8.

Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P.

Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* (2009) **14** (7): 2535-54.

Walker J.T., Bradshaw D.J., Fulford M.R., Marsh P.D.

Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl Environ Microbiol* (2003) **69** (6): 3327-32.

Walker J.T., Sonesson A., Keevil C.W., White D.C.

Detection of *Legionella pneumophila* in biofilms containing a complex microbial consortium by gas chromatography-mass spectrometry analysis of genus-specific hydroxy fatty acids. *FEMS Microbiol Lett* (1993) **113** (2): 139-44.

Wallis L., Robinson P.

Soil as a source of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (Lp1). *Aust N Z J Public Health* (2005) **29** (6): 518-20.

Wellinghausen N., Frost C., Marre R.

Detection of *legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl Environ Microbiol* (2001) **67** (9): 3985-93.

Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S.

Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* (2002) **295** (5559): 1487.

Winter J., Ilbert M., Graf P.C., Ozelik D., Jakob U.

Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* (2008) **135** (4): 691-701.

Woo A.H., Goetz A., Yu V.L.

Transmission of *Legionella* by respiratory equipment and aerosol generating devices. *Chest* (1992) **102** (5): 1586-90.

Wright J.B., Ruseska I., Athar M.A., Corbett S., Costerton J.W.

Legionella pneumophila grows adherent to surfaces in vitro and in situ. *Infect Control Hosp Epidemiol* (1989) **10** (9): 408-15.

Yaradou D.F., Hallier-Soulier S., Moreau S., Poty F., Hillion Y., Reyrolle M., Andre J., Festoc G., Delabre K., Vandenesch F., Etienne J., Jarraud S.

Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Appl Environ Microbiol* (2007) **73** (5): 1452-6.

Zhang L.H., Dong Y.H.

Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* (2004) **53** (6): 1563-71.

CHAPITRE VIII

Annexes

VIII.1 Annexe 1 : liste des figures

Figure II-1. Répartition des stations thermales en France – Conseil National des Exploitants Thermaux (CNETH, 2009).	18
Figure II-2. Exemples de douches utilisant de l'EMN : douche filiforme, douche pénétrante (ou modelage affusion), douche au jet.....	29
Figure II-3. Couloir de marche.....	30
Figure II-4. Cycle de réplication de <i>L. pneumophila</i> à l'intérieur de protozoaires (Molofsky et al., 2004).	49
Figure II-5. Cellule de <i>Hartmanella vermiformis</i> infectée par <i>L. pneumophila</i> , 12 h après infection (grossissement $\times 3400$). (Abu Kwaik et al., 1998).....	50
Figure II-6. Incidence de la maladie du Légionnaire en fonction de l'âge et du sexe, Centre National de Référence des Légionelles (CNR-L, 2008).	54
Figure II-7. A. Nombre de cas en France, en fonction du mois de l'année (moyennes \pm écarts-types). Les moyennes ont été établies sur les années 2005 à 2008, d'après les données de l'InVS résultant de Déclaration Obligatoire. B. Nombre de cas aux États-Unis en fonction du mois dans 4 régions (moyennes de 1990 à 2005) (Neil et al., 2008).....	56
Figure II-8. Structure du LPS de <i>L. pneumophila</i> séro groupe 1 (Kooistra et al., 2002).	59
Figure II-9. Séquence de développement du biofilm en trois phases : étape d'adhésion au support, étape de croissance (développement de microcolonies et synthèse de la matrice) et étape de détachement des cellules et retour à l'état planctonique. (Center for Biofilm Engineering, Bozeman, Montana, ÉU, 2003)	66
Figure II-10. Étapes d'adhésion de bactéries (en rouge) à une surface (S, en bleu). (1) Dépôt du film conditionnant (en vert) sur la surface. (2) Les bactéries en mouvement sont transférées vers la surface et co-agrégées. (3) Adhésion réversible des bactéries à la surface conditionnée par le biais de forces physico-chimiques notamment. (4) Adhésion irréversible des bactéries à la surface par la mise en jeu de mécanismes biologiques. Adapté de Bos et al. (1999).....	67
Figure II-11. Système d'interaction micro-organisme (M) / substrat solide (S) / liquide (L) (Bos et al., 1999).....	70
Figure II-12. Biofilm de <i>P. aeruginosa</i> (PAO1) cultivé en milieu minéral minimum, supplémenté en citrate (10 mM). A. Biofilm de 1 jour. B. Biofilm de 4 jours. En bleu, <i>P.aeruginosa</i> marqué par la CFP, en jaune, bactéries marquées par l'YFP (Klausen et al., 2003). Échelle = 20 μm	74
Figure II-13. Micrographie obtenue par microscopie confocale d'un biofilm multi-espèces (isolées d'un aquifère profond) développé sur une particule de charbon activé, en milieu contenant du toluène. Échelle = 500 μm . (Massol-Deya et al., 1995)	75
Figure II-14. Microcolonie d'un biofilm marquée par les lectines de <i>Triticum vulgare</i> (en rouge), <i>Tetragonolobus purpureus</i> (en bleu), <i>Arachis hypogaea</i> (en vert), faisant apparaître plusieurs microdomaines dans la matrice polysaccharidique (Lawrence et al., 2007).	78
Figure II-15. Section optique à travers un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> (PAO1) de 6 jours exprimant la GFP (en vert). L'ADN apparaît en rouge (marquage au DDAO) à l'intérieur des microcolonies (Allesen-Holm et al., 2006). Échelle non précisée.....	80
Figure II-16. A. Système de Quorum Sensing de type LuxR. La protéine LuxI (I) catalyse la production d'AHL. L'augmentation du nombre de bactéries provoque l'augmentation de la quantité d'AHL extracellulaire. La	

liaison de l' AHL au récepteur du signal (R) forme un complexe agissant comme un facteur de transcription. B. Système de Quorum Sensing AIP à 2 composants. Les signaux de Quorum Sensing sont détectés par un récepteur membranaire histidine-kinase et l'information est transférée aux gènes cibles par phosphorylation du régulateur de réponse (RR) (Zhang et al.,)	81
Figure II-17. Obus de raclage des canalisations (www.ab6.net).	91
Figure II-18. Formule chimique du PHMB.....	95
Figure III-1. Schéma du protocole d'évaluation de l'activité bactéricide sur cellules de <i>P. aeruginosa</i> en suspension (TA : température ambiante).....	104
Figure III-2. Schéma du protocole d'évaluation de la sensibilité des biofilms de <i>P. aeruginosa</i> aux traitements biocides	106
Figure III-3. Schéma synoptique du réseau-pilote.....	109
Figure III-4. GeneDisc et puits réactionnels. Un secteur de 6 puits représente les analyses réalisées pour un échantillon (2 témoins positifs, 1 témoin négatif, 3 quantifications d'échantillon).....	121
Figure III-5. Courbes de fluorescence en fonction du nombre de cycles dans les 6 puits dédiés à l'analyse d'un échantillon.	122
Figure III-6. Schéma du principe de l'analyse d'image.....	125
Figure IV-1. Réductions logarithmiques (moyennes \pm écarts-types) engendrées par le chlore sur cellules planctoniques de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (n=2). Blanc, temps de contact de 5 min. Noir, temps de contact de 1 h.	134
Figure IV-2. Réductions logarithmiques (moyennes \pm écarts-types) engendrées par le Sanosil ® (en ppm d'H ₂ O ₂) sur cellules planctoniques de PAO1 (n=2). Blanc, temps de contact 5 min. Noir, temps de contact 1 h.	135
Figure IV-3. Réductions logarithmiques (moyennes \pm écarts-types) engendrées par le PHMB sur PAO1 en suspension (n=3). Blanc, temps de contact 5 min. Noir, temps de contact 1 h.....	136
Figure IV-4. Biofilm de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 après 48 h d'incubation, observé au microscope inversé ($\times 400$) après coloration au cristal violet.	138
Figure IV-5. Réductions logarithmiques (moyennes \pm écarts-types) engendrées par des traitements chlorés sur biofilms de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (n=3).....	140
Figure IV-6. Réductions logarithmiques (moyennes \pm écarts-types) engendrées par le Sanosil ® (en ppm d'H₂O₂) sur biofilms de <i>P. aeruginosa</i> souche PAO1 (n=2).....	141
Figure IV-7. Réductions logarithmiques (moyennes \pm écarts-types) engendrées par le PHMB sur biofilms de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (n=4).	142
Figure IV-8. Concentrations moyennes et écarts-types (log UFC/mL) en flores revivifiables à 37 °C (gris clair) et 22 °C (gris foncé) aux différents points de prélèvement du réseau (n=5).	145
Figure IV-9. Concentrations moyennes et écarts-types (log UFC/mL) en FT 37 (trait plein) et FT 22 (trait pointillé) dans le réseau au cours du temps (n=11).	146
Figure IV-10. Concentrations en flores revivifiables (FT 22, gris foncé, FT 37, gris) en log UFC/mL et concentrations en <i>P. aeruginosa</i> (gris clair) en log UFC/250mL dans l'EMN en circulation, avant et après désinfection par choc thermique à 80 °C (n=11). La flèche indique le choc thermique. Les astérisques indiquent des valeurs de $p < 0,01$. À J7, 4 points présentaient des contaminations par <i>P. aeruginosa</i>	148

Figure IV-11. Concentrations en flores revivifiables (FT 22, gris foncé, FT 37, gris) en log UFC/mL et concentrations en *P. aeruginosa* (gris clair) en log UFC/250 mL dans l'EMN en circulation dans le réseau, avant et après désinfection par PHMB (25 ppm, n=11). La flèche représente le traitement de désinfection. Les astérisques indiquent des valeurs de $p < 0,01$. À J4, *P. aeruginosa* est détecté au niveau de 3 points de prélèvements. 150

Figure V-1. A. Biofilms de 6 jours observés par microscopie confocale, formés à 22,5 °C, 37,0 °C et 43,0 °C (projections maximales, souches CIP 103854 et HW S2-14). Les barres représentent 75 µm (ND = bactéries non détectées). B. Biomasse viable et cultivable adhérente après 6 j d'incubation en milieu SBB en fonction de la température (n =2). Les histogrammes blancs correspondent à un inoculum de 10^2 UFC/mL et les histogrammes gris un inoculum de 10^6 UFC/mL. 186

Figure V-2. Reconstitution volumique d'un agrégat dans un biofilm de 9 jours (souche HW S2-14) montrant l'éloignement des cellules au sein d'un même agrégat. 188

Figure V-3. Distribution volumique des résidus carbohydrates au sein d'un biofilm à *L. pneumophila* de 15 jours. Vert, Syto 9. Rouge, ConA-A633. 189

Figure V-4. Évolution de la concentration en *L. pneumophila* dans l'EMN en circulation dans le réseau-pilote (moyennes \pm écarts-types). A. Essai 1. B. Essai 2. Les flèches représentent les chocs thermiques à 80 °C..... 193

Figure V-5. Comparaisons des biofilms à *L. pneumophila* formés en BYE (Piao et al., 2006) à 25 °C (en haut à gauche) et à 37 °C (en haut à droite) et en SBB à 22,5 °C (en bas à gauche) et à 37 °C (en bas à droite). Échelle = 50 µm..... 198

VIII.2 Annexe 2 : liste des tableaux

Tableau II-1. Orientations du thermalisme et indications les plus fréquentes (Popoff, 1992; CNETH, 2005).....	20
Tableau II-2. Exposition aux dangers d'un patient en cure thermale (CNETH, 2008).	25
Tableau II-3. Catégories de soins en établissement thermal et caractéristiques (Abenhaim, 2000).	27
Tableau II-4. Taux de conformité des établissements thermaux français pour les paramètres microbiologiques de l'EMN, sur l'année 2001 (DGS, 2005).	32
Tableau II-5. Prévalence des micro-organismes associés à des infections nosocomiales en France en 2006 (InVS).	36
Tableau II-6. Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> et rôles. Adapté de Kipnis et al. (2006).	38
Tableau II-7. Principaux mécanismes de résistance de <i>P. aeruginosa</i> aux antibiotiques (Hancock et al., 2000).41	
Tableau II-8. CMI de 10 antiseptiques et désinfectants vis-à-vis de <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> (McDonnell et al., 1999).	43
Tableau II-9. Principaux caractères phénotypiques permettant de différencier les formes répliquatives et transmissives de <i>L. pneumophila</i> (Fields et al., 2002; Molofsky et al., 2004).	51
Tableau II-10. Facteurs favorisant parmi les cas survenus en France en 2008 (InVS).	55
Tableau II-11. Facteurs de virulence de <i>L. pneumophila</i> et rôles possibles (Steinert et al., 2002).	57
Tableau II-12. Désinfectants considérés actifs contre <i>L. pneumophila</i> (Kim et al., 2002).	62
Tableau II-13. Compatibilité des matériaux constitutifs des réseaux et traitements de nettoyage (CSHPF et al., 1999).	91
Tableau II-14. Compatibilité des matériaux constitutifs des réseaux et traitements de désinfection (CSHPF et al., 1999).	93
Tableau III-1. Propriétés physico-chimiques des eaux utilisées dans le réseau-pilote. Les concentrations ioniques ont été déterminées par chromatographie ionique. IS = concentrations inférieures au seuil de détection de la méthode.	108
Tableau III-2. Composition des milieux de culture utilisés pour la mise au point d'un protocole de formation de biofilms à <i>L. pneumophila</i>	118
Tableau IV-1. Réductions logarithmiques (moyennes \pm écarts-types) engendrées par traitement thermique sur cellules en suspension de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (n=2).	133
Tableau IV-2. Réduction logarithmique (moyenne \pm écart-type) engendrée par un choc thermique (80 °C, 1 h) sur biofilms de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (n=4).	139
Tableau V-1. RL (moyenne \pm écart-type) engendrée par un choc thermique à 80 °C de 1 h sur biofilms de <i>L. pneumophila</i> (n=2).	191

VIII.3 Annexe 3 : liste des abréviations

SIGLES

ADN : acide désoxyribonucléique
AFReTh : Association Française pour la Recherche Thermale
AFNOR : Association Française de Normalisation
ATCC : *American Type Culture Collection*
CIP : Collection Institut Pasteur
CMB : concentration minimale bactéricide
CMI : concentration minimale inhibitrice
CNETh : Conseil National des Exploitants Thermaux
CNR-L : Centre National de Référence des Légionelles
COA : carbone organique assimilable
CV : cristal violet
CT : choc thermique
DDASS : Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales
DGS : Direction Générale de la Santé
EAP : eau d'adduction potable
EDS : eau distillée stérile
EMN : eau minérale naturelle
EN : norme européenne
EPS : exopolysaccharide
ESCOT : *European Scientific Committee on Thermalisme*
FLBA : *Fluorescence Lectin Binding Analysis*
FISH : *Fluorescence In Situ Hybridization*
FT : flore totale
INOX : acier inoxydable
InVS : Institut National de Veille Sanitaire
IP : Iodure de Propidium
ISMH : *International Society on Medical Hydrology and Climatology*
ISO : norme internationale
LPS : lipopolysaccharide
MIF : *mature intracellular form*
ND : non détecté
NF : norme française
ORL : oto-rhino-laryngologie
PCR : *polymerase chain reaction*
PE : polyéthylène
PHMB : polyhexaméthylène biguanide

PP : polypropylène
PVC : polychlorure de vinyle
qPCR : PCR quantitative
RC : rouge Congo
RL : réduction logarithmique
SST3 : système de sécrétion de type 3
UV : ultra violet
VBNC : *Viable But Non Cultivable*
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

UNITES

% : pour cent
°C : degré Celsius
DO : densité optique
g : gramme
h : heure
Hz : hertz
j : jour
L : litre
log : logarithme
m : mètre
min : minutes
N : Newton
ppm : partie par million
rpm : rotation par minute
S : siemens
UFC : Unité Formant Colonie
UG : Unité Génome
UI : Unité Internationale
W : Watts
c- : centi-
m- : milli-
μ- : micro-
n- : nano-

VIII.4 Annexe 4 : composition des milieux de culture**Tableau 1. Tryptone Soja Agar (TSA – bioMérieux, Marcy l'Étoile, France).**

<i>Composition</i>	<i>Concentrations (g/l)</i>
Tryptone	15,0
Peptone de soja	5,0
Chlorure de sodium	5,0
Agar	15,0

Tableau 2. Milieu R2A.

<i>Composition</i>	<i>Concentrations (g/L)</i>
Extrait de levure*	0,50
Hydrolysate de caséine*	0,50
Peptone protéose*	0,50
Dextrose*	0,50
Amidon soluble*	0,50
Phosphate dipotassique*	0,30
Sulfate de magnésium heptahydraté*	0,05
Pyruvate de sodium*	0,30

*VWR, Fontenay-sous-Bois, France

Tableau 3. Tryptose Sulfite Cyclosérine (TSC – Oxoid, Basingstoke, Royaume Uni).

<i>Composition</i>	<i>Concentrations (g/L)</i>
Tryptose	15,0
Peptone de soja	5,0
Extrait de viande de bœuf	5,0
Extrait de levure	5,0
Métabisulfite de sodium	1,0
Citrate de fer ammoniacal	1,0
D-cyclosérine	0,4
Agar	19,0

Tableau 4. Gélose CN (AES, Bruz, France).

<i>Composition</i>	<i>Concentrations (g/L)</i>
Peptone de gélatine	16,00
Hydrolysate de caséine	10,00
Sulfate de potassium	10,00
Chlorure de magnésium	1,40
Cétrimide	2,00
Acide nalidixique	0,15
Agar	11,00

Tableau 5. Gélose PCA (Oxoid, Basingstoke, Royaume Uni).

<i>Composition</i>	<i>Concentrations (g/L)</i>
Extrait de levure	2,5
Tryptone	5,0
Glucose	1,0
Agar	10,0

Tableau 6. Bouillon Acétamide (AES, Bruz, France).

<i>Composition</i>	<i>Concentrations (g/L)</i>
Dihydrogénophosphate de potassium	1,0
Sulfate de magnésium anhydre	0,2
Acétamide	2,0
Chlorure de sodium	0,2
Molybdate de sodium	5×10^{-3}
Sulfate de fer	$0,5 \times 10^{-3}$
Agar	10,0

Tableau 7. Gélose Slanetz et Bartley (Oxoid, Basingstoke, Royaume Uni).

<i>Composition</i>	<i>Concentrations (g/L)</i>
Tryptose	20,0
Extrait de levure	5,0
Glucose	2,0
Phosphate disodique, 2 H ₂ O	4,0
Azoture de sodium	0,4
Chlorure de tétrazolium	0,1
Agar	10,0

Tableau 8. Gélose Bile Esculine Agar (BEA - Oxoid).

<i>Composition</i>	<i>Concentration (g/L)</i>
Peptone	8,0
Sels biliaries	20,0
Citrate ferrique	0,5
Esculine	1,0
Agar	15,0

Tableau 9. Gélose TTC-Tergitol 7 (Oxoid).

<i>Composition</i>	<i>Concentrations (g/L)</i>
Peptone	10,00
Extrait de levure	6,00
Extrait de viande	5,00
Lactose	20,00
Bleu de bromothymol	0,02
Tergitol 7	0,10
Agar	13,00

Tableau 10. Bouillon Tryptophane (Oxoid).

<i>Composition</i>	<i>Concentration (g/L)</i>
Digestat tryptique de caséine	10,00
L-Tryptophane	1,00
Chlorure de sodium	5,00

Tableau 11. Tampon pH = 2 (isolement des Légionelles).

<i>Composition</i>	<i>Concentrations (mol/L)</i>
HCl (VWR)	0,18
KCl (VWR)	0,01

Tableau 12. Milieux BCYE, avec ou sans cystéine et GVPC (bioMérieux).

<i>Composition</i>	<i>Concentrations (g/L)</i>
Charbon activé	2,00
Extrait de levure	10,00
Tampon ACES/hydroxyde de potassium	10,00
Pyrophosphate ferrique	0,25
Chlorhydrate de L-cystéine*	0,40
α -cétoglutarate	1,00
Glycine [†]	3,00
Vancomycine [†]	1×10^3
Polymyxine [†]	40000 [‡]
Cycloheximide [†]	0,80
Agar	13,0

* seulement dans les milieux BCYE avec cystéine et GVPC

[†] seulement dans le milieu GVPC[‡] UI

Tableau 13. Gélose au sang (bioMérieux).

<i>Composition</i>	<i>Concentrations (g/L)</i>
Peptone spéciale	23,0
Amidon	2,0
Chlorure de sodium	5,0
Colistine	0,01
Aztréonam	2×10^{-3}
Sang défibriné de mouton	50,0*
Agar	10,0

* en mL

Tableau 14. Bouillon Eugon (bioMérieux).

<i>Composition</i>	<i>Concentrations (g/L)</i>
Tryptone	15,00
Peptone papainique de soja	5,00
Glucose	5,00
NaCl	4,00
L-cystine	0,30
Sulfite de sodium	0,20
Citrate de sodium	1,00

Tableau 15. Neutralisant.

<i>Composition</i>	<i>Concentration (g/L)</i>
Tween 80 (Sigma, St Louis, MO, ÉU)	80,0
Thiosulfate de sodium (Sigma, St Louis, MO, ÉU)	4,0
Saponine (Acros, Geel, Belgique)	16,0
Lécithine (Acros, Geel, Belgique)	16,0
Tryptone Soja Bouillon (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France)	24,0

Tableau 16. Buffered Yeast Extract (BYE).

<i>Composition</i>	<i>Concentration (g/L)</i>
Extrait de levure (AES, Bruz France)	10,00
Chlorhydrate de L-cystéine (supplément <i>Legionella</i> bioMérieux)	0,40
Pyrophosphate ferrique (supplément <i>Legionella</i> bioMérieux)	0,25
Tampon ACES (Merck, Darmstadt, Allemagne)	10,00

VIII.5 Annexe 5 : liste des communications

Liste des communications dans des congrès internationaux :

Date	Lieu	Titre	Type de communication
12-2007	Séville (Espagne)	BIOMICROWORLD International conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology	Orale
10-2008	Munich (Allemagne)	Biofilms III International Conference	Poster
09-2009	Rome (Italie)	Eurobiofilm	Poster
10-2009	Paris (France)	Legionella 2009 – International conference on Legionella	Orale
06-2010	Paris (France)	37 th World Congress of International Society of Medical Hydrology and Climatology	Orale
09-2010	Winchester (Royaume-Uni)	Biofilms IV International Conference	Poster

Liste des communications dans des congrès nationaux :

Date	Lieu	Titre	Type de communication
05-2007	Nantes	VII ^{ème} congrès de la Société Française de Microbiologie	Poster
06-2007	Poitiers	Croissance et Contrôle des Légionelles	Poster
10-2007	Lyon	1 ^{er} colloque national Legionella et légionellose	Poster
01-2008	Paris	Réunion de la Société Française d'Hydrologie et Climatologie Médicale	Orale
11-2008	Bagnères-de-Bigorre	Réunion Thermale d'Automne AFTH	Orale
06-2010	Marseille	VIII ^{ème} congrès de la Société Française de Microbiologie	Poster

Publication dans une revue internationale référencée :

S. Pécastaings, M. Bergé, K.M. Dubourg, C. Roques. (2010) « *Sessile Legionella pneumophila is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms* », *Biofouling*, 26 :7, 809-819

Autre publication :

S. Pécastaings, K.M. Dubourg, C. Roques. (2009) « *Évaluation de l'efficacité de techniques de désinfection utilisées en milieu thermal sur un réseau d'eau minérale naturelle* », *Presse Thermale et climatique*, 146, 19-29

VIII.6 Annexe 6 : publication

Press Therm Climat 2009;146:19-29

ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE TECHNIQUES DE DÉSINFECTION UTILISÉES EN MILIEU THERMAL SUR UN RÉSEAU D'EAU MINÉRALE NATURELLE PILOTE

S PÉCASTAINGS^{1,2}, KM DUBOURG², C ROQUES¹

Résumé

La composition physico-chimique d'une eau minérale naturelle lui confère des propriétés favorables à la santé. Selon la réglementation française, cette eau doit avoir la même composition et le même degré de pureté à l'origine et au point d'usage. En conséquence, aucun désinfectant résiduel ne peut être utilisé pour traiter une eau minérale naturelle. Il est donc primordial de bien entretenir les réseaux de canalisation d'eau minérale naturelle afin de limiter la prolifération microbienne et éviter le développement du biofilm. Les travaux présentés ici nous ont permis de déterminer la sensibilité *P. aeruginosa* et de *L. pneumophila* aux traitements de désinfection (choc thermique ou choc chimique). Nous avons pour cela utilisé un véritable réseau, alimenté en eau minérale naturelle de Dax, nous permettant de nous rapprocher au maximum des conditions au sein d'un établissement thermal.

Les épisodes de désinfection par chocs chimique ou thermique se sont révélés très efficaces contre *P. aeruginosa*, puisque immédiatement après désinfection, aucune unité formant colonie (UFC) n'a été détectée dans l'eau minérale naturelle en circulation. Toutefois, une recontamination rapide a été constatée 4 ou 7 jours après la désinfection. En ce qui concerne *L. pneumophila*, les analyses ont montré que la contamination se maintenait dans le réseau malgré deux chocs thermiques effectués à une semaine d'intervalle.

Le modèle de réseau utilisé lors de ces essais constitue un bon outil d'évaluation des protocoles d'entretien des réseaux, permettant d'explorer à la fois l'impact immédiat et à distance de la phase de traitement. Ce modèle nous a permis de montrer l'efficacité limitée des traitements mis en œuvre. Il serait à présent intéressant de modifier et de coupler les protocoles de désinfection afin d'améliorer la rémanence des traitements et donc maintenir durablement la qualité de l'eau thermique.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, eau minérale, désinfection, microbiologie, étude pilote.

Abstract

Evaluation of disinfection techniques used in thermal spa establishments via a mineral water pilot system.

The physical and chemical properties of natural mineral water are at the origin of its importance to health. According to French law, mineral water must have the same chemical composition

¹ Université de Toulouse ; UPS, LU 49, Adhésion bactérienne et formation de biofilms, 35 chemin des Maraichers, 31062 Toulouse cedex 9, France

² Institut du thermalisme - Université Victor-Segalen-Bordeaux2, 8 rue Sainte Ursule, 40100 Dax, France
Courriels : sophie@pecastaings.net ; karine.dubourg@u-bordeaux2.fr ; christine.roques@cict.fr

and the same purity from the source to the point of use. Hence, no residual disinfectant can be used to treat a natural mineral water, and good maintenance is crucial in limiting microbial proliferation and avoiding biofilm development. This work aimed to determine the sensitivity of *P. aeruginosa* and *L. pneumophila* to disinfection treatments. For that purpose, we used a real water pipe system, containing natural mineral water from Dax (France), mimicking conditions found in a thermal spa establishment.

Two types of treatments were tested on the contaminated water system : thermal disinfection and chemical disinfection. Contamination consisted either of *P. aeruginosa* or *L. pneumophila*. Treatment efficacy was determined by numerating *P. aeruginosa* or *L. pneumophila* in the freely circulating natural mineral water, before and after treatment. Chemical or thermal disinfections were effective in the short term against *P. aeruginosa* ; immediately after treatment, no CFU were detected in the natural mineral water. However, recontamination was found 4 or 7 days after treatment. Thermal disinfection alone was tested on *L. pneumophila*. Quantitative PCR analysis showed that contamination remained in the water system, eventhough 2 thermal disinfections were made. This model of a water pipe system is a good tool for the evaluation of disinfection protocols used in thermal spa establishments, allowing us to assess both immediate and long-term treatment impact. This model allowed us to show the limited efficacy of tested treatments. It would now be of relevant interest to modify and couple disinfection protocols in order to improve treatment remanence and maintain sustainable water quality.

Key words : *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, mineral water, water microbiology, pilot study.

1. Introduction

Un mauvais entretien des réseaux de canalisations d'eau peut être lourd de conséquences pour les établissements thermaux. L'eau minérale naturelle (EMN) qui circule dans les réseaux des établissements thermaux a des caractéristiques particulières, une composition physico-chimique et microbiologique spécifique qui lui confère des propriétés favorables à la santé [1]. Pour ne pas altérer leurs caractères naturels, ces eaux ne peuvent pas faire l'objet de traitements chimiques (chloration par exemple) avant utilisation aux postes de soins de l'établissement thermal : la composition physico-chimique de l'eau doit être la même à l'émergence et aux points d'usage [2].

Par conséquent, pour éviter la détérioration de la qualité de l'eau minérale naturelle dans les établissements thermaux, il est nécessaire d'assurer une bonne maintenance des réseaux de canalisations [3]. Il s'agit notamment de limiter les dépôts (tartre, micro-organismes) et la corrosion en effectuant des opérations de nettoyage et de désinfection régulières. Ces opérations de maintenance doivent notamment permettre de limiter, voire d'éliminer le biofilm, communauté bactérienne fixée sur les canalisations. En France, la réglementation du 19 juin 2000 décrit les techniques de nettoyage et de désinfection applicables aux réseaux d'EMN [4].

Deux micro-organismes font l'objet d'une surveillance accrue dans les établissements thermaux : *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila*.

P. aeruginosa est une bactérie ubiquiste souvent rencontrée dans les milieux humides où elle forme des biofilms. Elle représente un risque sanitaire pour les personnes fragilisées,

immunodéprimées. En tant que pathogène opportuniste, il est à l'origine d'une grande variété d'infections : auriculaires, oculaires, urinaires, infections de la peau ou des voies respiratoires [5].

L. pneumophila est l'agent étiologique de la fièvre de Pontiac et de la maladie du Légionnaire. Ce bacille à Gram négatif est fréquemment isolé en eaux douces et a la capacité de coloniser les systèmes d'eaux artificiels où il peut poser de graves problèmes sanitaires. Dans l'environnement, cette bactérie a développé un mode de multiplication original, à l'intérieur de cellules de protozoaires qu'elle lyse avant de coloniser d'autres cellules. Ce système de multiplication est probablement à l'origine de la pathogénicité de *L. pneumophila* chez l'homme. *L. pneumophila* a en effet la capacité de se multiplier dans les macrophages pulmonaires, causant une pneumopathie parfois létale [6].

Les techniques de désinfection des réseaux d'EMN dont il est question ici font l'objet de validations, avant leurs mises sur le marché, qui permettent de vérifier si elles répondent à certains critères d'efficacité sur des micro-organismes problématiques (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) [7]. Cependant ces méthodes de validation *in vitro* ne prennent pas toujours en compte la particularité des conditions micro-environnementales (température, pH, charge minérale, dépôts de tartre ou corrosion), ni la complexité des communautés microbiennes des réseaux d'EMN (biofilm). L'originalité de ce travail réside donc dans l'évaluation *in situ* de méthodes de désinfection utilisées en milieu thermal, grâce à un outil de recherche conçu spécifiquement, un réseau pilote "eau thermale". Ce pilote a été artificiellement contaminé par *P. aeruginosa* ou *L. pneumophila* puis des protocoles de désinfection ont été appliqués et évalués et leur efficacité à court et moyen termes évaluée.

2. Matériel et méthodes

2.1. Souches bactériennes

***Pseudomonas aeruginosa*.** La souche utilisée est un isolat environnemental, isolé par la méthode de détection de *P. aeruginosa* (norme NF EN 12780 [8]) dans un réseau d'eau chaude. La souche a été conservée dans du bouillon Eugon (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) additionné de 15 % de glycérol à - 80°C. Avant les essais, les cultures stock ont été repiquées moins de 3 fois sur gélose TSA (Trypcase Soja Agar, bioMérieux). Une suspension pour l'inoculation du réseau a été réalisée en effectuant une culture dans 200 mL de milieu R2A liquide [9], maintenue à 37°C et agitée par agitateur magnétique (400 rpm) pendant 12h. Le milieu a alors été éliminé par centrifugation de la suspension à 3400 trs/min (15 min) et le culot bactérien a été repris dans 200 mL d'eau déminéralisée (opération renouvelée 3 fois), immédiatement avant le transfert de la suspension bactérienne dans le ballon du réseau "eau thermale". La concentration bactérienne s'élevait alors à $8,0 \times 10^8$ UFC/mL.

***L. pneumophila*.** La souche utilisée dans cette étude est un isolat environnemental isolé par la méthode NF T 90-431 à partir d'une eau de surface. La souche a été conservée dans du bouillon Eugon additionné de 15 % de glycérol à - 80°C. Avant les essais, les

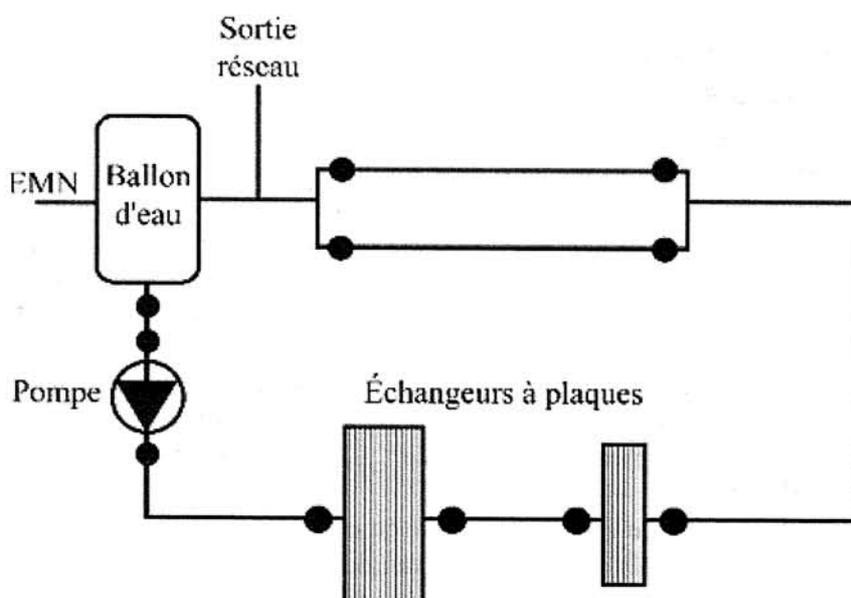
cultures stock ont été repiquées moins de 3 fois sur gélose BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract), incubée à 37°C pendant 72 h. Une suspension pour l'inoculation du réseau a été réalisée en préparant une culture dans 50 mL de milieu YEB (Yeast Extract Broth, stérilisé par filtration sur membrane, [10]), maintenue à 37°C et agitée (400 rpm) pendant 24 h. Cette suspension a servi à inoculer 1 litre de milieu YEB incubé à nouveau pendant 12 h. Le milieu a alors été éliminé de la suspension par centrifugation à 3400 trs/min (15 min) et le culot bactérien a été repris dans 300 mL d'eau déminéralisée (opération renouvelée 3 fois), immédiatement avant le transfert de la suspension bactérienne dans le ballon du réseau "eau thermique". La concentration bactérienne s'élevait alors à $6,1 \times 10^6$ UFC/mL.

2.2. Réseau pilote "eau thermique"

Le réseau pilote "eau thermique" (figure 1) peut être alimenté soit en EMN de Dax ($\text{Na}^+=128.9$ mg/L, $\text{K}^+=20.8$ mg/L, $\text{NH}_4^+=0.2$ mg/L, $\text{Ca}^{2+}=127.0$ mg/L, $\text{Mg}^{2+}=35.0$ mg/L, $\text{SO}_4^{2-}=432.1$ mg/L, $\text{Cl}^-=153.9$ mg/L, $\text{Fe}^{2+}=0.08$ mg/L, $\text{pH}=7.4$), soit en eau du réseau d'adduction publique. Il est constitué d'inox 316L (acier au chrome, nickel et molybdène). Le ballon d'eau a une capacité de 500 litres et est équipé d'une résistance chauffante permettant les désinfections par chocs thermiques (élévation de la température à 80°C). La mise sous pression de l'eau est assurée par une pompe à débit variable ajustée pour les essais à 3600 ± 100 L/h. Les échangeurs à plaques abaissent la température de l'EMN de 60,1°C (au niveau du ballon) à 38°C (après le 1^{er} échangeur) puis à 28°C (après le 2nd échangeur). Lors des essais, le circuit a été utilisé en système ouvert une heure par jour pour mimer une utilisation quotidienne.

Figure 1. Schéma du réseau pilote "eau thermique".

Les points représentent les points de prélèvements.



Après avoir versé la suspension bactérienne appropriée (*P. aeruginosa* ou *L. pneumophila*) dans le ballon préalablement rempli d'EMN refroidie (40°C), l'eau contaminée a été mise en circulation pendant 30 min (système fermé, avec retour de l'eau en fin de réseau vers le ballon) puis laissée en mode statique pendant 48 h.

2.3. Essais de désinfection du pilote

Le choc thermique a été réalisé en remplissant le ballon de 400 L d'eau du réseau d'adduction de la ville de Dax (température = 24±2°C). Cette eau a été chauffée pendant 5 h jusqu'à ce que la température atteigne 80°C dans le ballon et au moins 70±5°C dans le reste du réseau. L'eau a été mise en circulation dans le pilote "eau thermale" pendant 1 h (réseau fermé). En fin de manipulation, le pilote est vidangé et rincé pendant 5 min avec de l'EMN [4].

Le PolyHexaméthylène Biguanide (PHMB) a été utilisé dans le cadre d'un protocole de désinfection chimique, à une concentration de 25 mg/L dilué d'eau de ville (T°=24±2°C), au niveau du ballon du pilote "eau thermale". Cette solution a ensuite été mise en circulation dans le pilote pendant 1h15 (réseau fermé). Après cet épisode de désinfection, le pilote a été rincé avec de l'EMN pendant 30 minutes.

2.4. Prélèvements d'eau minérale naturelle

Onze points de prélèvements flambables permettent de prélever l'eau en amont et en aval des principaux éléments du réseau "eau thermale" (ballon, pompe, échangeurs). Après élimination du premier jet, les robinets de prélèvements sont flambés pendant quelques secondes. L'EMN a été collectée dans des flacons de polyéthylène haute densité de 1 L (ADL Prochilab), stérilisés par ionisation et ne contenant pas de neutralisant. Les échantillons d'eau ont été analysés dans les 24 h suivant le prélèvement ou après 48 h avec conservation de l'échantillon à 4°C.

2.5. Analyses de la contamination microbiologique dans le réseau "eau thermale"

Tout au long des essais, la contamination du réseau a été déterminée par des analyses microbiologiques de l'EMN en circulation dans le réseau, aux 11 points de prélèvements.

Les méthodes utilisées étaient celles préconisées par les normes AFNOR à la date de l'étude. Selon la réglementation du 19 juin 2000, relative à la gestion du risque microbien dans les établissements thermaux, aucun micro-organisme pathogène ou de contamination fécale ne doit être détecté dans 250 mL d'eau par ces méthodes d'analyses.

La flore totale hétérotrophe revivifiable (à 22 et 37°C) [11], les coliformes totaux et thermotolérants [12], les entérocoques [13] et les spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices [14] ont été recherchés dans le réseau "eau thermale" durant toute la durée des essais, afin de vérifier l'absence de contamination extérieure anormale.

P. aeruginosa. Les analyses ont été effectuées en filtrant 250 mL d'EMN échantillonnée sur une membrane en ester de cellulose stérile de porosité nominale 0,45 µm. La membrane a été transférée sur milieu CN (Oxoid) et incubée 48 h, à 37°C. Les colonies présumées de *P. aeruginosa* (bleues à vertes) ont été examinées sous lampe UV (360 nm)

pour vérifier leur fluorescence. Elles ont ensuite été repiquées dans un bouillon acétamide pour vérifier leur capacité à produire de l'ammoniac à partir d'acétamide [8].

Légionelles [15]. Les analyses ont été effectuées selon la norme en filtrant 1 litre d'EMN échantillonnée sur membrane stérile en polycarbonate de porosité nominale 0,45 µm. L'ADN des cellules récupérées sur les membranes a été extrait selon les instructions du fabricant (Genesystems), en utilisant l'appareil Genextract et le kit d'extraction correspondant (Genesystems) : les cellules ont été lysées par sonication (251 watts, 40 Hz, 20 min) et traitement à la chaleur (100°C, 10 min). L'ADN a été purifié sur colonne de silice et élué avant de procéder à une PCR quantitative. Les échantillons d'ADN ont été mélangés au mix de PCR (Genesystem) et analysés en triplicata. Un contrôle positif et négatif de PCR a été réalisé pour chaque échantillon. Un contrôle négatif a été réalisé pour chaque série d'extraction. Les courbes de calibration ont été réalisées avec de l'ADN de *L. pneumophila* (GeneSystems).

3. Résultats

3.1. Détermination de l'activité bactéricide du choc thermique et d'un choc chimique (PHMB) sur une contamination par *P. aeruginosa* dans le réseau "eau thermique"

3.1.1. Désinfection par choc thermique à 80°C

Des essais préliminaires menés *in vitro* ont permis de vérifier que le choc thermique à 80°C était efficace sur cellules planctoniques ou en biofilm (données non présentées) : une élévation de température à 70°C pendant 5 minutes permet l'élimination d'au moins 5 log d'UFC.

Les tests concernant l'efficacité du choc thermique à 80°C ont été menés sur pilote "eau thermique" inoculé par *P. aeruginosa*. Aucune contamination par des coliformes, des entérocoques ou spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices n'a été détectée lors de ces essais, que ce soit avant ou après le choc de désinfection.

P. aeruginosa a été détecté dans le réseau "eau thermique" après inoculation de la bactérie, aux 11 points de prélèvements (4,89x10³ UFC/mL en moyenne, voir tableau I). Immédiatement après la désinfection, les concentrations de *P. aeruginosa* étaient inférieures au seuil de détection dans tout le réseau (1 UFC/250 mL). Toutefois, une semaine après la désinfection, *P. aeruginosa* a de nouveau été détecté au niveau de 4 points de prélèvement : les points 5 à 8 présentaient notamment des concentrations en *P. aeruginosa* supérieures à 150 UFC/250 mL.

3.1.2. Désinfection par le PHMB

Des tests menés *in vitro* sur la bactérie *P. aeruginosa* ont permis de vérifier que ce produit était bactéricide à différentes concentrations (20, 25, 30, 35 mg/L) après 1 heure de traitement sur cellules planctoniques (données non fournies).

Lors de cet essai, le pilote a été inoculé par *P. aeruginosa*, puis une désinfection par PHMB a été appliquée (concentration 25 mg/L, dans de l'eau d'adduction potable),

Tableau I : Concentration en *P. aeruginosa* dans le pilote “eau thermale” inoculé, avant et après désinfection par choc thermique à 80°C

Points de prélèvements	Concentration en <i>P. aeruginosa</i> (UFC/250 mL)		
	Avant désinfection	24 h après désinfection	7 j après désinfection
1	3,98x10 ⁶	-	-
2	2,13x10 ⁶	-	-
3	3,25x10 ⁶	-	-
4	5,00x10 ⁶	-	-
5	1,25x10 ⁶	-	>150
6	1,68x10 ⁶	-	>150
7	4,00x10 ⁶	-	>150
8	1,25x10 ⁶	-	>150
9	7,50x10 ⁶	-	-
10	5,00x10 ⁶	-	-
11	4,53x10 ⁶	-	-

- : concentration inférieure au seuil de détection (<1 UFC/250 mL)

pendant 1h15 min. Après désinfection, le réseau a été rincé par de l'EMN puis de l'EMN neuve a été mise en circulation quotidiennement.

Après inoculation du pilote, la concentration moyenne en *P. aeruginosa* aux 11 points de prélèvements était de 5,86x10² UFC/250 mL (tableau II). Trois jours après la désinfection, aucune bactérie de l'espèce *P. aeruginosa* n'a été détectée dans le réseau. Cependant, dès le quatrième jour suivant la désinfection, des concentrations dépassant les taux acceptables ont été constatées au niveau de trois points de prélèvements.

Tableau II : Répartition de la contamination par *P. aeruginosa* dans le pilote “eau thermale” inoculé après désinfection par le PHMB

Nombre de points de prélèvements contaminés (concentration en <i>P. aeruginosa</i> en UFC/250 mL)		
Avant désinfection	3 jours après désinfection	4 jours après désinfection
11 (5,86x10 ²)	0	3 (21)

3.2. Détermination de l'activité bactéricide du choc thermique sur une contamination de *L. pneumophila* dans le réseau “eau thermale”

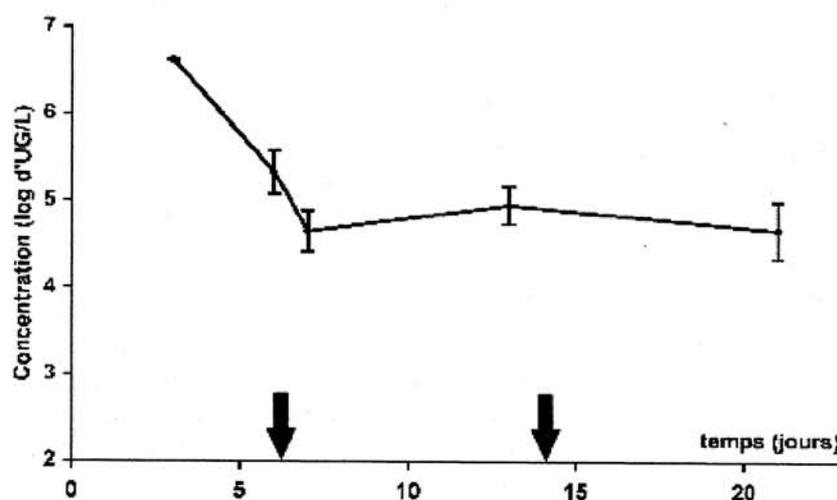
Lors de cet essai, le réseau a été inoculé par *L. pneumophila* puis deux désinfections par choc thermique (80°C) ont été appliquées avec de l'eau d'adduction potable, pendant 1 h (à 6 et 13 jours). Après ces chocs de désinfection, le réseau a été rincé par de l'EMN puis de l'EMN neuve a été mise en circulation quotidiennement. La concentration en

L. pneumophila aux points de prélèvements a été déterminée par PCR quantitative, par 5 séries d'analyses suivant la contamination initiale.

La figure 2 montre l'évolution de la concentration en *L. pneumophila* dans le réseau pendant 21 jours. Au cours de la première semaine suivant l'inoculation, la concentration en *L. pneumophila* circulant dans le réseau passe de 6,62 log d'UG/L à 5,33 log d'UG/L. Un choc thermique a été réalisé au jour 6. Les analyses avant et après choc montrent que la concentration en *L. pneumophila* dans le pilote a diminué de moins d'1 log d'UG/L ($4,65 \pm 0,21$ log d'UG/L). Cette diminution est cependant difficilement imputable au choc thermique et semble résulter de la diminution naturelle de la concentration en légionelles dans l'eau du réseau. Les analyses d'eau ultérieures (à 13 et 21 j.) montrent que la concentration en légionelles n'a pas varié et reste supérieure à 4 log d'UG/L et ce malgré un nouveau choc thermique à 14 j.

Figure 2. Évolution de la concentration en *L. pneumophila* en log d'UG/L dans le réseau "eau thermale" au cours du temps (n=11).

Les flèches représentent les épisodes de désinfection par choc thermique.



4. Discussion

4.1. Efficacité du choc thermique

Lorsque le pilote est artificiellement contaminé par *P. aeruginosa*, un choc thermique à 80°C permet une bonne élimination temporaire de la contamination (aucun *P. aeruginosa* n'a été détecté dans l'eau après désinfection). Ce résultat correspond aux résultats des essais *in vitro* selon la norme NF EN 1040 qui ont montré qu'un choc thermique de 60 min à 70°C permettait d'éliminer 10^6 UFC de *P. aeruginosa*. En revanche, la recontamination du pilote à la suite du choc thermique est rapide : 7 jours après la désinfection, 4 points de prélèvement sont contaminés par *P. aeruginosa*, à des concentrations

supérieures à 150 UFC/250 mL, valeurs non acceptables selon la réglementation du 19 juin 2000.

D'après la littérature, *P. aeruginosa* présente une faible résistance à la chaleur [16] et des études menées en réseau hospitalier montrent qu'il est possible d'éliminer la bactérie en effectuant des traitements thermiques hebdomadaires [5]. Toutefois, *P. aeruginosa* a la capacité de former des biofilms, ce qui lui permet de mieux résister aux chocs biocides que des bactéries planctoniques [17]. Cappelli et al. ont étudié plusieurs techniques pour désinfecter un système d'hémodialyse contaminé par un biofilm de *P. aeruginosa*. Pour eux, la désinfection thermique s'est révélé être la moins efficace des méthodes testées [18]. Lors de nos essais, il est possible qu'un biofilm se soit développé au sein du pilote, entraînant ainsi une baisse de l'efficacité de la désinfection et une recontamination rapide de l'eau du réseau.

En ce qui concerne *L. pneumophila*, les concentrations d'UFC en suspension ont été obtenues par PCR quantitative. Les résultats montrent que les chocs thermiques appliqués sur le réseau "eau thermale" ne permettent pas d'éliminer une contamination par cette bactérie. Les données de la littérature montrent toutefois qu'une augmentation de la température au-delà de 60° permet l'inactivation de *L. pneumophila* dans un réseau d'eau [19].

Il est à noter que la concentration de *L. pneumophila* a été évaluée par PCR quantitative uniquement. Des mesures par culture sur milieux GVPC ont été effectuées, mais étaient inexploitable (légionelles détectées et non-quantifiables ou non dénombrées du fait de la présence d'une flore interférente importante). La technique de PCR quantitative permet de dénombrer les bactéries viables au sein d'un réseau mais également les bactéries viables non cultivables ainsi que les bactéries mortes (dont l'ADN intact reste en suspension dans l'eau du réseau après désinfection). D'autres essais devraient être effectués pour valider la corrélation entre les résultats obtenus par PCR quantitative et par culture sur milieu GVPC. Toutefois, les quantifications effectuées au jour 13 (8 j. après le premier choc thermique) et au jour 21 (7 j. après le second choc thermique) ne prennent probablement pas en compte les bactéries mortes après les épisodes de désinfection, leur ADN ayant très probablement été dégradé durant ce laps de temps.

Il est à noter que tous ces essais ne permettent de quantifier que les bactéries planctoniques, en suspension dans l'EMN en circulation. Il serait intéressant de vérifier l'impact des traitements biocides sur les bactéries adhérentes (biofilms) fixées sur les canalisations.

4.2. Efficacité du choc chimique (PHMB)

La désinfection par le PHMB a permis d'éliminer provisoirement la contamination par *P. aeruginosa* dans le réseau "eau thermale". En effet, trois jours après la désinfection, aucun *P. aeruginosa* n'était détecté (voir tableau II) et l'eau répondait donc aux critères de qualité imposés par la réglementation du 19 juin 2000. Ce résultat concorde avec les résultats obtenus lors d'essais de bactéricidie *in vitro* qui montrent que des concentrations de 20 à 35 mg/L de PHMB permettent d'éliminer 10⁶ UFC de *P. aeruginosa* planctoniques. Cependant, 4 jours après la désinfection, *P. aeruginosa* était de nouveau détecté en trois points du pilote. Comme pour le choc thermique, la recontamination est très rapide. La résistance aux agents antibactériens (biocides et antibiotiques) des

bactéries au sein de biofilms est un phénomène bien décrit dans la littérature [20]. Il est possible que les bactéries inoculées aient formé un biofilm ou colonisé un biofilm déjà mis en place dans le réseau. Ainsi, le PHMB aurait eu une bonne activité sur les bactéries planctoniques, mais une activité partielle sur le biofilm, à l'origine de la recontamination du réseau. En outre, une étude récente montre que les *Pseudomonadaceae* au sein d'un microcosme sont peu sensibles au PHMB [21].

Pour améliorer les résultats, de nouveaux essais pourraient être menés, en modifiant le protocole de désinfection par le PHMB (concentration d'utilisation et temps de contact). Il serait également intéressant de coupler cette méthode de désinfection avec un choc thermique, par exemple.

5. Conclusion

Les résultats de ces essais montrent que les traitements de désinfection testés sur le réseau pilote contaminé par la bactérie *P. aeruginosa* ont une bonne efficacité immédiate : après traitements, aucune bactérie n'a été détectée dans l'eau minérale naturelle en circulation. Toutefois, la recontamination du réseau a été observée en moins d'une semaine, quel que soit le traitement appliqué. Il serait intéressant de coupler plusieurs méthodes de désinfection ou d'augmenter les concentrations en biocides testées afin d'avoir un meilleur impact sur le biofilm et éviter la détérioration rapide de la qualité de l'eau.

En ce qui concerne *L. pneumophila*, la contamination du réseau a été maintenue pendant les essais, sur une période de 3 semaines. L'application de deux traitements thermiques n'a pas permis d'abaisser la concentration en *L. pneumophila*. D'autres traitements doivent à présent être testés pour permettre un retour à une qualité d'eau acceptable.

Remerciements

Sophie Pécastaings remercie l'Afreth (Association française pour la recherche thermale) pour la bourse de jeune chercheur qui lui a été octroyée, ainsi que le Conseil général des Landes. Les auteurs expriment leur gratitude envers la société Genesystems (Bruz, France), qui a mis à disposition un appareil GeneExtract et un GeneDiscCycler et fourni les réactifs nécessaires aux analyses par q-PCR.

Références

1. Décret n° 89-369 du 9 juin 1989 relatif aux eaux minérales naturelles et aux eaux potables préemballées, in *Journal Officiel* 1989:7202-7205.
2. Décret n°57-404 du 28 mars 1957 portant règlement d'administration publique sur la police et la surveillance des eaux minérales, in *Journal Officiel* 1957:3346-3348.
3. Popoff G. Les bonnes pratiques d'exploitation des eaux minérales dans un établissement thermal. *Press Therm Climat* 1992;129,3:192-201.
4. Circulaire DGS/VS 4 n° 2000-336 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale naturelle dans les établissements thermaux. 2000.
5. Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* 2005;33,5 Suppl 1:S41-9.
6. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease : 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15,3:506-26.

7. AFNOR, NF EN 1040. Antiseptiques et désinfectants chimiques : essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de base des antiseptiques et désinfectants chimiques. 2006.
8. Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* par filtration sur membrane, in NF EN 12780. 2002.
9. Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 1985;49,1:1-7.
10. Ristroph JD, Hedlund KW, Gowda S. Chemically defined medium for *Legionella pneumophila* growth. *J Clin Microbiol* 1981;13,1:115-9.
11. Dénombrement des micro-organismes revivifiables, in EN ISO 6222. 1999.
12. Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes, in NF EN ISO 9308-1. 2000.
13. Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux, in NF EN ISO 7899-2. 2000.
14. Recherche et dénombrement de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridia*), in NF EN 26461-1, ISO 6461-1. 1993.
15. AFNOR, XPT90-47. Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). 2006.
16. Spinks AT et al. Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. *Water Res* 2006;40,6:1326-32.
17. Cochran WL, McFeters GA, Stewart PS. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol* 2000;88,1:22-30.
18. Cappelli G et al. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18,10:2105-11.
19. Kim BR et al. Literature review - Efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res* 2002;36,18:4433-44.
20. Campanac C et al. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46,5:1469-74.
21. Moore LE et al. *In vitro* study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. *Appl Environ Microbiol* 2008;74,15:4825-34.

Title : The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* biofilm models in the amelioration of water quality in natural mineral water systems

Abstract :

Spa treatment is a traditional form of medicine using natural mineral waters, that concerns 500,000 patients each year in France. Water pipes are often colonized by biofilms that harbor potential pathogens like *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila*. Hence, their disinfection must be frequent and effective.

The objective of the thesis is the evaluation of treatments available to spa owners against *P. aeruginosa* and *L. pneumophila*, evaluating the capacity of these bacteria to form biofilms and the specific conditions found in spa buildings. *In vitro* and real conditions assays were used.

Results show a loss of sensitivity to treatments of *P. aeruginosa* in biofilm form that leads to partial effectiveness in real condition assays.

For *L. pneumophila*, most of the work consisted in designing an *in vitro* biofilm formation model. The use of this model showed that thermal disinfection destroys all cultivable bacteria. The evolution of the model will integrate parameters that explain the failure of disinfection treatments in natural mineral water systems.

AUTEUR : Sophie Pécastaings

TITRE : Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles

DIRECTRICES DE THÈSE : Christine ROQUES et Michèle CAPDEPUY

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le 17 novembre 2010

RESUMÉ :

Le thermalisme est une médecine ancestrale utilisant les eaux minérales naturelles (EMN) qui concerne chaque année 500000 patients. Les canalisations d'eau des établissements thermaux pouvant être le support de biofilms, à l'origine de la libération de pathogènes potentiels dans l'EMN (dont *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila*), les désinfections de ces réseaux doivent être fréquentes et efficaces.

L'objectif de cette thèse est l'évaluation des traitements à disposition des exploitants, contre *P. aeruginosa* et *L. pneumophila*, en prenant en compte la capacité des bactéries à produire un biofilm et la spécificité des réseaux d'EMN. Des techniques *in vitro* et en conditions réelles de traitements (réseau-pilote) ont été testées.

Les résultats montrent une perte de sensibilité de *P. aeruginosa* vis-à-vis des traitements sous forme biofilm et qui conduit à une efficacité partielle en réseau-pilote.

Pour *L. pneumophila*, la majeure partie des travaux a consisté à mettre au point un modèle de formation de biofilms mono-espèce *in vitro* qui a permis de démontrer qu'un choc thermique éliminait les bactéries cultivables du biofilm. L'évolution de ce modèle permettra d'intégrer les paramètres conduisant à l'échec des traitements en réseaux d'EMN.

Titre et résumé en anglais au recto de la dernière page

MOTS-CLEFS : *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, réseaux d'eau, thermalisme, biofilms, désinfection

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Ingénieries Microbienne et Enzymatique

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

LU49, Adhésion bactérienne et formation de biofilms, Faculté de Pharmacie, Université Paul Sabatier, 35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse cedex 09