

DOSSIER DE CANDIDATURE

APPEL A CANDIDATURE

VOLET SCIENTIFIQUE

**Centre national de référence des *Legionella*
Mandature 2023-2027**

Demande de renouvellement

Sophie Jarraud & Ghislaine Descours



Institut des Agents Infectieux
LBMMS du CHU de Lyon
Hôpital de la Croix Rousse
Centre de Biologie Nord - Bâtiment O
103 Grande rue de la Croix Rousse
69004 LYON

cnr-legionelles.univ-lyon1.fr

Table des matières

1	NOTE DE PRESENTATION ET ENGAGEMENTS.....	6
1.1	COURRIER OFFICIEL D'ACTE DE CANDIDATURE	6
1.2	PRESENTATION SYNTHETIQUE.....	7
1.3	DECLARATION PUBLIQUE D'INTERETS.....	9
2	DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE.....	9
2.1	L'ORGANISATION PROPOSEE POUR REpondre AU CAHIER DES CHARGES.....	9
2.2	LES MOYENS DU LABORATOIRE AFFECTES AU CNR.....	9
2.2.1	<i>En matière de ressources humaines.....</i>	<i>9</i>
2.2.2	<i>En matière d'équipements et de logistique.....</i>	<i>17</i>
2.3	UN BREF DESCRIPTIF DES THEMATIQUES DE RECHERCHE DU LABORATOIRE DANS LE DOMAINE D'EXPERTISE DU CNR POUR LEQUEL IL CANDIDATE	19
2.4	LES CAPACITES TECHNIQUES DU LABORATOIRE	20
2.4.1	<i>Liste des techniques disponibles pour le diagnostic, l'identification, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux</i>	<i>20</i>
2.4.2	<i>Liste des techniques disponibles pour le typage, y compris en termes de séquençage génomique.....</i>	<i>23</i>
2.4.3	<i>Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence disponibles : description (nombre de souches notamment), conditions de stockage, conditions de mise à disposition.....</i>	<i>23</i>
2.4.4	<i>Bases de données de séquences</i>	<i>26</i>
3	ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES (2017 - 2021)	27
3.1	RESUME DES ACTIVITES (2017-2021)	28
3.2	ACTIVITES AU TITRE DE L'EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE (2017-2021).....	29
3.2.1	<i>Expertise dans le diagnostic des légionelloses</i>	<i>29</i>
3.2.2	<i>Expertise dans l'identification et la caractérisation des agents infectieux</i>	<i>40</i>
3.2.3	<i>Expertise dans l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux.....</i>	<i>44</i>
3.2.4	<i>Expertise dans la détection des légionelles de l'environnement.....</i>	<i>45</i>
3.2.5	<i>Application et développement des techniques innovantes (NGS, WGS, Sérologie haut débit,...) 50</i>	
3.2.6	<i>Constitution de banques de souches / matériels de référence.....</i>	<i>52</i>
3.2.7	<i>Souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués.....</i>	<i>52</i>
3.2.8	<i>Transfert des techniques vers des laboratoires.....</i>	<i>52</i>
3.2.9	<i>Travaux de recherche appliquée en lien avec les activités du CNR.....</i>	<i>53</i>
3.3	CONSEIL AUX PROFESSIONNELS ET AUX AUTORITES DE SANTE	57
3.3.1	<i>Production et contribution aux guides, recommandations.....</i>	<i>57</i>
3.3.2	<i>Activité de conseil et d'expertise.....</i>	<i>58</i>
3.3.3	<i>Conseils aux autorités de santé nationales.....</i>	<i>59</i>
3.3.4	<i>Production d'outils de rétroinformation (site internet ...)</i>	<i>60</i>
3.3.5	<i>Enseignement, formation, accueil de stagiaires.....</i>	<i>61</i>
3.4	CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE	63
3.4.1	<i>Suivi des caractéristiques des agents et des infections</i>	<i>63</i>
3.4.2	<i>Réseau de partenaires</i>	<i>77</i>
3.4.3	<i>Surveillance de la résistance de Legionella aux anti-infectieux</i>	<i>78</i>
3.4.4	<i>Participation à des études concourant à la surveillance (2017 - 2021)</i>	<i>79</i>
3.4.5	<i>Collaborations avec d'autres CNR et/ou laboratoires experts (santé animale, environnementale, alimentaire.....)</i>	<i>81</i>
3.4.6	<i>Contribution aux réseaux internationaux de surveillance et d'expertise (ECDC, OMS).....</i>	<i>82</i>
3.5	CONTRIBUTION A L'ALERTE	83
3.5.1	<i>Procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de cas groupés et de phénomènes anormaux.....</i>	<i>83</i>
3.5.2	<i>Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux.....</i>	<i>85</i>
4	LISTE DES PUBLICATIONS	87
4.1	PUBLICATIONS NATIONALES	87
4.2	PUBLICATIONS INTERNATIONALES	88
4.3	COMMUNICATIONS NATIONALES.....	91

4.4	COMMUNICATIONS INTERNATIONALES.....	95
4.5	CONFERENCES SUR INVITATIONS.....	101
4.6	OUVRAGE OU CHAPITRE D'OUVRAGE	102
5	DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITE ET GARANTIES MISES EN ŒUVRE AU SEIN DU	
	LABORATOIRE	103
5.1	ACCREDITATION.....	103
5.2	STRUCTURE QUALITE DU LABORATOIRE.....	103
5.3	EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE (EEQ).....	105
5.4	AUDITS.....	105
5.5	LOGICIEL DE GESTION DE LA QUALITE.....	106
5.6	AVANCEMENT DE LA DEMARCHE	106
6	DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE	106
7	PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2023-2027	
	107	
7.1	ACTIVITES D'EXPERTISE.....	108
7.1.1	<i>Réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer</i>	<i>108</i>
7.1.2	<i>Les techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents en</i>	
	<i>développement ou dont le développement est prévu</i>	<i>108</i>
7.1.3	<i>Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections ;.....</i>	<i>110</i>
7.1.4	<i>Les travaux d'évaluations de techniques envisagés.....</i>	<i>112</i>
7.1.5	<i>Les projets de transferts de techniques vers d'autres laboratoires.....</i>	<i>113</i>
7.1.6	<i>Les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR.....</i>	<i>113</i>
7.2	ACTIVITES DE CONSEIL, FORMATION ET INFORMATION	117
7.2.1	<i>Projets de formation envisagés.....</i>	<i>117</i>
7.2.2	<i>Modalités de diffusion de recommandations et informations aux professionnels concernés et</i>	
	<i>les modalités prévues de rétro-information vers l'ensemble des partenaires du CNR.....</i>	<i>117</i>
7.2.3	<i>Collaborations à des expertises éventuellement prévues auprès d'instances nationales ou</i>	
	<i>internationales :</i>	<i>118</i>
7.3	CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE.....	118
7.3.1	<i>Projets de constitution, développement et animation de réseaux de partenaires</i>	<i>118</i>
7.3.2	<i>Modalités de surveillance de la résistance aux anti-infectieux et aux biocides.....</i>	<i>119</i>
7.3.3	<i>Contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels</i>	<i>119</i>
7.3.4	<i>Contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux ;.....</i>	<i>119</i>
7.3.5	<i>Projets d'enquêtes ou études concourant à la surveillance.</i>	<i>120</i>
7.4	CONTRIBUTION A L'ALERTE	122
8	ANNEXES	123

Liste des Figures

Figure 1. Organigramme fonctionnel du CNR.....	16
Figure 2. Espaces du R+1 de l'IAI (espaces en jaune) affectés au CNR des Staphylocoques et des Légionelles.	18
Figure 3. Répartition des méthodes diagnostiques des cas de légionelloses déclarés entre 1998 et 2021 (Données SpF).	30
Figure 4. Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR.	31
Figure 5. Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche disponible parmi l'ensemble des cas notifiés en France (données SpF).....	32
Figure 6. Répartition des partenaires nous ayant envoyé une souche clinique de <i>Legionella</i> . 2017 (N = 84); 2018 (N = 86); 2019 (N = 86); 2020 (N = 68); 2021 (N = 78).....	32
Figure 7. Répartition des partenaires nous ayant envoyé un prélèvement pour mise en culture. 2017 (N=142) ; 2018 (N=159) ; 2019 (N=175) ; 2020 (N=153) ; 2021 (N=192).....	33
Figure 8. Répartition des partenaires nous ayant envoyé un prélèvement pour diagnostic. 2017 (N=64) ; 2018 (N=52) ; 2019 (N=77) ; 2020 (N=40) ; 2021 (N=38).....	34
Figure 9. Schéma de l'étude de l'évaluation de 16 tests urinaires par le groupe ESGLI.....	37
Figure 10 : Résultats de la comparaison des 16 UATS pour différentes concentrations de LPS pour 9 sous-groupes de Lp1.....	39
Figure 11. Evolution du nombre de souches cliniques reçues et isolées au CNR entre 2017 et 2021.....	40
Figure 12. Distribution des souches d'origine environnementale adressées au CNR-L de 2017 à 2021, (A) en termes de séro groupe des souches de <i>L. pneumophila</i> ; (B) en termes d'espèce des souches de <i>Legionella non pneumophila</i>	42
Figure 13 Distribution de l'ADN étalon et du contrôle quantitatif de 2013 à 2021.....	46
Figure 14. Résultats des Corrélation entre la ddPCR et la qPCR sur 10 prélèvements positifs.....	48
Figure 15: Pipeline d'analyse des données de WGS. Pipeline codé sous Nextflow appelant des images singularity.....	51
Figure 16 : Différentes approches utilisées dans l'étude ProgLegio.....	54
Figure 17 : Taux d'ADN pulmonaire à J0 en fonction de la sévérité des patients à J0 (TBA : Tracheo-Bronchial aspirate et BAL : Broncho Alveolar Lavage).....	55
Figure 18 : Heat-map représentant la sécrétion plasmatique des cytokines différenciellement exprimées chez les patients sévères par rapport aux non-sévères et la sévérité.....	55
Figure 19 Evolution du nombre de cas de légionellose sur une année, 1988-2021 (données SpF).....	64
Figure 20. Distribution du taux de notification standardisé* des cas de légionellose selon la région de domicile en France, 2021.....	65
Figure 21. Nombre de cas mensuels notifiés de légionellose en France selon la date de début des signes, 2010-2021.....	66
Figure 22. Evolution du Workflow de typage des isolats cliniques et environnementaux de <i>Legionella pneumophila</i> au CNR.....	69
Figure 23. Evolution du nombre de WGS annuel effectués au CNR.....	70
Figure 24. Proportion des ST de <i>Legionella pneumophila</i> entre 2015 et 2021.....	71
Figure 25. Répartition des 10 principaux ST de <i>Legionella pneumophila</i> isolées de prélèvement cliniques entre 2015 et 2021.....	72
Figure 26. Minimum spanning tree basé sur les 50 gènes du cgMLST. Les couleurs représentent les ST basés sur les 7 gènes du SBT.....	73
Figure 27. Arbre phylogénétique basé sur les SNPs du core genome des souches de Lp de 2020 et 2021.....	74
Figure 28. Proportion des différentes sous espèces de <i>Legionella pneumophila</i> entre 2015 et 2021.....	75
Figure 29. Evolution des investigations totales entre 2017 et 2021 en fonction de la provenance des souches environnementales.....	76
Figure 30 : Evolution des investigations positives entre 2017 et 2021 en fonction de la provenance des souches environnementales.....	77
Figure 31. (A) Distribution du taux de notification standardisé des cas de légionellose selon la région de domicile en France, 2021 (données SpF) ; (B) Distribution du nombre d'investigations de cas de légionellose selon la région de domicile en France, 2021.....	78
Figure 32. Courbe épidémique des cas de légionellose en fonction du début des signes cliniques.....	86
Figure 33. Minimum spanning tree of 21 <i>L. pneumophila</i> serogroup 1 ST62. Light blue charts represent environmental isolates from the collective biomass heating plant, dark blue charts represent the isolates from the patients, red numbers represent SNPs.....	87
Figure 34 : Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001-03).....	104
Figure 35 : Extrait de Organigramme qualité du laboratoire de l'institut des Agents Infectieux.....	105
Figure 36 : Expression différentielle de 96 gènes de l'immunité chez les patients atteints de Légionellose en comparaison avec des volontaires sains (stimulant LPS).....	115

Figure 37. Courbe épidémique des cas de légionellose en fonction du début des signes cliniques	142
Figure 38. Courbe épidémique des cas de légionellose en fonction de la date de début des signes (n=11).....	143
Figure 39. Minimum spanning tree SBT et cgMLST.....	147

Liste des Tableaux

Tableau 1. Personnels affectés à l'activité du CNR des légionelles.....	17
Tableau 2. Composition de l'équipe Pathogénie des légionelles – équipe #5 du CIRI.....	20
Tableau 3. Collections de souches, sérums et autres prélèvements au CNR des Légionelles.....	24
Tableau 4. Numéros d'accèsion des différentes études déposées à l'ENA.....	26
Tableau 5. Evolution de l'activité d'expertise du CNR depuis 2017.....	29
Tableau 6 : Liste des UATS testés dans l'étude européenne ESGLI	37
Tableau 7 Répartition en termes d'espèces de <i>Legionella</i> et de sérogroupes de <i>L. pneumophila</i> des souches d'origine cliniques isolées en France, 2017-2021.* réactions croisées en immunofluorescence directe	41
Tableau 8 : Distribution des CMI des 5 antibiotiques testés par microdilution avec les techniques « maison » et MICRONAUT-S, représentée en nombre de souches présentant une CMI donnée :	45
Tableau 9 Proportion des ST le <i>Legionella pneumophila</i> entre 2015 et 2021.....	71
Tableau 10. Expositions à risque parmi les cas de légionellose survenus en France, 2019-2021 (données SpF).....	75
Tableau 11. Investigations épidémiologiques réalisées entre 2017 et 2021.....	76
Tableau 12 : Modes de stockage de la collection du CNR	111

Annexes

Annexe 1. Déclaration publique d'intérêts de Sophie Jarraud.
Annexe 2. Déclaration publique d'intérêts de Ghislaine Descours.
Annexe 3. Evaluation de l'équipe de recherche <i>Legionella</i> pathogenesis par l'HCERES
Annexe 4. Evaluation de l'équipe de recherche <i>Legionella</i> pathogenesis par l'INSERM (CSS7)
Annexe 5. Précisions sur l'investigation des cas groupés de légionellose depuis 2011 – 2015
Annexe 6. Lettre d'agrément pour le transfert de matériel du CNR des légionelles

1 NOTE DE PRESENTATION ET ENGAGEMENTS

1.1 COURRIER OFFICIEL D'ACTE DE CANDIDATURE



CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES LEGIONELLES

LEGIONELLES
Centre National de Référence

INSTITUT DES AGENTS INFECTIEUX
HOPITAL DE LA CROIX ROUSSE
CENTRE DE BIOLOGIE NORD – BATIMENT O
103 GRANDE RUE DE LA CROIX ROUSSE
69004 LYON

Pr Sophie JARRAUD
☎ 04 72 07 16 38
✉ sophie.jarraud@chu-lyon.fr

Dr Ghislaine DESCOURS
☎ 04 72 07 16 50
✉ ghislaine.descours@chu-lyon.fr

Dr Laetitia Beraud
☎ 04 72 07 18 44
✉ laetitia.beraud@chu-lyon.fr

Dr Camille Allam
☎ 04 72 07 16 71
✉ camille.allam@chu-lyon.fr

Dr Marine Ibranosyan
☎ 04 72 07 11 93
✉ marine.ibranosyan@chu-lyon.fr

Pr Florence Ader
☎ 04 72 07 15 60
✉ florence.ader@chu-lyon.fr

Christophe Ginevra
☎ 04 72 11 54 12
✉ christophe.ginevra@chu-lyon.fr

Madame La Directrice
Agence Nationale de Santé Publique

Lyon, 1er juin 2022

Objet : Lettre de candidature CNR des Légionelles

Madame la Directrice,

Les Hospices Civils de Lyon se portent candidat pour assurer la mission de **Centre National de Référence (CNR) des Légionelles** dans le respect des dispositions fixées par le décret 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et du cahier des charges fixé par l'arrêté du 2 mars 2022.

Nous vous adressons, ci-joint, l'ensemble du dossier de candidature.

Pr Sophie JARRAUD

Directeur du CNR des Légionelles

1.2 PRESENTATION SYNTHETIQUE

Etat de la question scientifique

Les *Legionella*, bactéries ubiquistes et hydrotelluriques, sont considérées pour l'homme comme des bactéries opportunistes. *Legionella* est principalement responsable de pneumonies aiguës le plus souvent communautaires, sévères dans près de la moitié des cas avec une hospitalisation en unité de soins intensifs. La létalité globale est estimée à 11 %, celle-ci peut atteindre plus de 30% chez les patients en soins intensifs ou les cas nosocomiaux. La légionellose est une problématique de santé publique liée principalement à l'usage de l'eau. **La voie de transmission** reconnue chez l'homme est **l'inhalation d'aérosols infectieux** provenant d'environnements aquatiques. La contamination à partir de poussière de sols contaminés a été décrite notamment pour l'espèce *L. longbeachae*, suggérant que des voies de contamination annexes pour *L. pneumophila* pourraient être investiguées. A noter que la **transmission interhumaine n'est pas rapportée** à l'exception d'un cas pour la première fois en 2016.

L'évolution du contexte épidémiologique de la légionellose en France est marquée par l'absence d'épidémie mais par **une augmentation du nombre de cas depuis 2016** (à l'exception de 2020). Cette augmentation survient après une stabilisation (et la non diminution) du nombre de cas entre 2005 et 2015 malgré la mise en œuvre de réglementations successives encadrant la surveillance de diverses installations de réseaux d'eau chaude sanitaire (établissements de santé, établissements d'accueil des personnes âgées, établissements recevant du public), des bains à remous, des systèmes de refroidissement des tours aéro réfrigérantes, des installations à risques dans les établissements thermaux et des systèmes collectifs de brumisation d'eau. Ainsi, malgré la mise en place de ces mesures règlementaires, le risque de légionellose n'est pas maîtrisé. A noter que les réseaux d'eau des bâtiments d'habitation collectifs, des maisons et des logements individuels ne font pas, en 2022, l'objet d'obligation de surveillance des légionelles. La majorité (60%) des cas diagnostiqués en France étant des cas communautaires sans exposition particulière rapportée, la part des domiciles est fortement suspectée pour ces cas mais cette question n'a jamais été résolue.

Ces dernières années ont également été marquées par deux épisodes de recrudescence importante de cas **sporadiques**, sur une courte période au niveau national, en Juin 2018 et Juillet 2021. **La question des sources à l'origine de la dispersion des légionelles dans l'environnement reste entière** : aucune source d'exposition n'a pu être reliée à la survenue des cas pendant ces épisodes. Les travaux de SpF suggèrent **l'influence des facteurs météorologiques** pour expliquer ces recrudescences, notamment la température, les précipitations et l'humidité qui semblent être, selon les différentes études réalisées ces dernières années, des variables clés dans la survie et la dispersion des légionelles dans l'environnement

Sur le plan environnemental et en lien avec ces données épidémiologiques, il faut noter deux faits actuels marquants concernant les légionelles. **Le 4^{ème} Plan national Santé environnement 4 (PNSE 4, 2021-2025) « un environnement, une santé »** publié conjointement par les ministères chargés de la santé et de l'écologie en mai 2021, fixe 20 priorités d'actions en matière de santé-environnement dont l'action n°12 intitulée « Mieux comprendre et prévenir les cas de légionellose ». L'un des deux axes d'action prévoit l'exploration de la **part potentielle des cas de légionellose due aux contaminations à domicile** via les réseaux de distribution d'eau. Ce PNSE4 s'inscrit également dans le contexte de la **Directive 2020/2184 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2020** relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine qui prévoit de nouvelles dispositions visant **les installations privées de distribution d'eau** et notamment une surveillance des légionelles. L'application de cette nouvelle directive va très vite impliquer des évolutions importantes concernant les demandes de détection des légionelles environnementales en France et en Europe et probablement conduire à rediscuter de la stratégie nationale concernant la place des méthodes alternatives pour la détection des légionelles. Un des enjeux important et passionnant est de mieux comprendre la contamination de l'Homme, le rôle des conditions météorologiques sur la survie des légionelles dans l'environnement (le second axe du PNSE4) ou leur capacité à infecter l'Homme, et d'identifier d'autres sources non suspectées jusqu'à présent.

La première description par le CNR en 2021 d'une souche de *Legionella pneumophila* **hautement résistante aux macrolides** isolée du réseau d'eau d'un hôtel repositionne la question de la résistance chez *Legionella*. Celle-ci est exceptionnelle concernant les fluoroquinolones (3 cas décrits) et n'avait jamais été décrite pour les macrolides. Plus que l'inquiétude sur les échecs thérapeutiques induites par ces résistances encore exceptionnelles, cette détection pose la question des facteurs environnementaux induisant l'acquisition de cette résistance chez *Legionella* et de la dissimulation de telle souche. Ce point encourage à poursuivre la veille sur la résistance des légionelles aux antibiotiques et conforte l'intérêt des nombreux travaux réalisés ces dernières années par le CNR sur la résistance des *Legionella* aux macrolides ; de tels travaux devront également être élargit à la résistance aux biocides et à l'étude de l'impact potentiel des biocides sur l'acquisition de l'antibiorésistance.

Le **séquençage systématique** des génomes de *Legionella* pour discriminer les souches afin de mieux identifier les sources de contamination est opérationnel et à révolutionner les investigations épidémiologiques. Les données épidémiologiques cliniques ainsi que les analyses microbiologiques environnementales restent et apparaissent primordiales pour répondre à la question des sources de contamination non identifiées. Cette question implique en

parallèle **une amélioration de l'isolement de souches d'origine clinique**, une souche n'est disponible que pour 25% des légionelloses notifiées. Les nouvelles étapes déjà en cours vont concerner le développement d'outils permettant de s'approcher du **séquençage de génome complet en absence d'isolat**, applicable sur échantillons cliniques et environnementaux soit par des approches de capture de génomes complets ou de séquençage shotgun post-déplétion en ADN eucaryote. **L'utilisation plus large de la PCR** sur prélèvements pulmonaires, recommandé par tous les CNR européens, qui semble poursuivre son essor en 2020 devrait permettre d'augmenter le diagnostic des légionelloses notamment à *L. pneumophila* non sérotype 1 et aux *L.* non *pneumophila*. Le développement en parallèle d'outils de métagénomique sur échantillons cliniques pourrait permettre dans le futur de mieux évaluer la place des *Legionella* dans les infections extra-pulmonaires.

La **meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et de réponse de l'hôte impliqués dans la sévérité** des légionelloses est une question primordiale sur laquelle le CNR est impliquée depuis de nombreuses années notamment dans le cadre de l'étude nationale ProgLegio. Ces travaux en lien avec l'activité du CNR ont notamment pour objectif la caractérisation de nouveaux marqueurs diagnostiques, l'identification de biomarqueurs pronostiques et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

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

- A- L'amélioration de la surveillance et de la prévention environnementale
- B- L'exploration de sources de contamination non investiguée jusqu'alors
- C- L'amélioration du diagnostic de l'ensemble des légionelloses et l'exploration des formes atypiques
- D- La meilleure compréhension des facteurs associés à l'acquisition de l'infection ainsi qu'aux formes sévères de légionellose
- E- La veille sur la sensibilité des légionelles aux antibiotiques et aux biocides.
- F- Le développement d'outils de métagnomique pour le diagnostic et l'investigation des cas utilisables sur échantillons cliniques et environnementaux

Candidature pour le CNR des *Legionella*

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

Au cours de ce prochain mandat, nous souhaitons poursuivre notre rôle central dans la surveillance clinique et environnementale de la légionellose et par différentes approches mieux comprendre la part des différents facteurs (environnementaux, bactériens, hôte) qui conduisent au développement et à la sévérité de la maladie. Par ailleurs si notre candidature est retenue nous coordonnerons la grande étude nationale LEGIODOM sur l'exploration de la part potentielle des cas de légionellose due aux contaminations à domicile en collaboration avec SpF et en appui de la DGS dans le cadre du PNSE4.

Nos forces résident dans l'expérience et les compétences acquises sur *Legionella* depuis la découverte de cette bactérie et au réseau de collaboration mis en place tant sur le territoire français qu'au niveau international. L'équipe proposée a un large ancrage hospitalo-universitaire avec la participation de cliniciens, de microbiologistes et de chercheurs et est adossée à l'équipe pathogénie des légionelles (LEGIOPATH) du Centre de Recherche International en Infectiologie (CIRI). Enfin le CNR de part son implantation à l'Institut des Agents Infectieux à l'hôpital de la Croix Rousse tout comme les 3 autres CNR candidats à Lyon (Staphylocoques, virus des infections respiratoires, entérovirus et parechovirus) bénéficiera de l'ensemble de l'infrastructure et des technologies de ce centre, notamment de la plateforme de séquençage haut-débit GenEPII - Plateforme de Génomique à visée Epidémiologique des maladies Infectieuses – créée aux Hospices Civils de Lyon dans le cadre de la pandémie COVID en lien avec le consortium EMERGEN (Consortium pour la surveillance et la recherche sur les infections à pathogènes EMERgents via la GENomique microbienne), coordonné par Santé publique France et l'ANRS|Maladies infectieuses émergentes.

1.3 DECLARATION PUBLIQUE D'INTERETS

Les déclarations publiques d'intérêts du Pr Sophie Jarraud et du Dr Ghislaine Descours sont en annexe 1 et 2.

2 DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE

2.1 L'ORGANISATION PROPOSEE POUR REpondre AU CAHIER DES CHARGES

L'ensemble des laboratoires de Biologie des Hospices Civils de Lyon est regroupé au sein d'un seul Laboratoire de Biologie Médicale Multisite (LBMMS) du CHU de Lyon. Dans le cadre de la restructuration des activités de Biologie du CHU de Lyon, le regroupement de l'ensemble des activités de microbiologie (Bactériologie, Virologie, Parasitologie-Mycologie, Hygiène environnementale) a été acté par les instances en 2011. Le CNR des légionelles est, et sera, localisé s'il est renouvelé à l'Institut des Agents Infectieux (IAI) sur le site de l'hôpital de la Croix Rousse, l'un des grands laboratoires de microbiologie de CHU en France, regroupant environ 180 personnels biologistes et techniciens. Il assure une prise en charge de la microbiologie 24h/24, 7 jours/7 (modèle 24-7) pour environ 5000 lits d'hospitalisation grâce à une plateforme de Bactériologie automatisée, une plateforme de Sérologie infectieuse, une plateforme de Biologie moléculaire, une unité de diagnostic des Mycobactéries à vocation régionale, une unité de Virologie conventionnelle et une autre de Parasitologie-Mycologie hors automatisation et une plateforme de séquençage haut-débit GenEPII. Il héberge également, s'ils sont renouvelés, le CNR des Staphylocoques et 2 CNR associés en virologie (CNR associés pour entérovirus - parechovirus, et des virus des infections respiratoires) et un Centre de Ressources Biologiques. Les activités des CNR de bactériologie (staphylocoques et légionelles) sont installées au 1er étage du bâtiment où ils bénéficient de locaux spécifiquement adaptés à leur activité (cf infra). Les CNR bénéficieront par ailleurs de l'environnement de l'IAI pour ce qui concerne les fonctions transverses et les équipements spécialisés.

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

2.2 LES MOYENS DU LABORATOIRE AFFECTES AU CNR

2.2.1 En matière de ressources humaines

Le projet pour le CNR des *Legionella* est présenté avec une co-direction assurée par le Pr Sophie Jarraud (Responsable) et par le Dr Ghislaine Descours (Co-responsable). Toutes les personnes mentionnées dans l'organigramme auront un rôle majeur en participant selon leur spécificité à l'accomplissement des missions du CNR.

2.2.1.1 Curriculum vitae des responsables scientifiques

Responsable : Sophie JARRAUD

Sophie Jarraud s'engage à assurer la durée du mandat en cas de nomination. La lettre d'engagement est ci-dessous.



CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES LEGIONELLES

LEGIONELLES
Centre National de Référence

INSTITUT DES AGENTS INFECTIEUX
HOPITAL DE LA CROIX ROUSSE
CENTRE DE BIOLOGIE NORD – BATIMENT O
103 GRANDE RUE DE LA CROIX ROUSSE
69004 LYON

Pr Sophie JARRAUD
☎ 04 72 07 16 38
✉ sophie.jarraud@chu-lyon.fr

Dr Ghislaine DESCOURS
☎ 04 72 07 16 50
✉ ghislaine.descours@chu-lyon.fr

Dr Laetitia Beraud
☎ 04 72 07 18 44
✉ laetitia.beraud@chu-lyon.fr

Dr Camille Allam
☎ 04 72 07 16 71
✉ camille.allam@chu-lyon.fr

Dr Marine Ibranosyan
☎ 04 72 07 11 93
✉ marine.ibranosyan@chu-lyon.fr

Pr Florence Ader
☎ 04 72 07 15 60
✉ florence.ader@chu-lyon.fr

Christophe Ginevra
☎ 04 72 11 54 12
✉ christophe.ginevra@chu-lyon.fr

Lyon, 2 avril 2022

Objet : **Lettre engagement à assurer la durée du mandat**

Je soussignée Sophie Jarraud m'engage à assurer la durée du mandat en cas de nomination comme responsable scientifique du Centre National de Référence des Légionelles pour la mandature 2023 – 2027.

Pr Sophie JARRAUD

Directeur du CNR des Légionelles

Fonction actuelle

- Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Faculté de médecine Lyon Est / Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon)
- Directrice du CNR des Légionelles depuis 2012 (co-responsable 2006 – 2011 avec le Pr Jérôme Etienne)
- Co-Responsable de l'équipe pathogénie des légionelles (LegioPath) du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI) (avec le Dr Patricia Doublet)
- Direction médicale de la Plateforme NGS de l'Institut des Agents Infectieux (Co-responsabilité avec Dr L. Josset et Dr J. Menotti) (depuis 2021), Unité Fonctionnelle UF 24464

Cursus

- Professeur des Universités – Praticien Hospitalier (2018), 1ère classe (2021)
- Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier (2002), Hors classe (2015)
- Assistante Hospitalo-Universitaire en Microbiologie (1998 – 2002)
- Attachée (11 vacations par semaine) en Microbiologie (1996 – 1998)
- Interne des Hôpitaux de Lyon, DES de Biologie Médicale (1992 – 1996)

Etablissements :

N° d'inscription au Conseil National de l'Ordre des Pharmaciens : 00105331

N° RPPS : 10004105929 ; N° CPS : 2300165891

Adresse hospitalière

Institut des Agents Infectieux
Hopital de la Croix-Rousse,
Centre de Biologie Nord - Bât O
103 Grande Rue de la Croix Rouse
69004 LYON
Tel : 04. 72. 07. 16. 38
Courriel : sophie.jarraud@chu-lyon.fr

Adresse universitaire

Equipe Legiopath - CIRI
U1111 INSERM-CNRS-UCBL-ENSL
Domaine Scientifique de la Doua, Université Lyon 1
Bat. André LWOFF, 3ème étage 10 rue Raphaël Dubois
69622 Villeurbanne
Courriel : sophie.jarraud@univ-lyon1.fr

Diplômes / Formation

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

Responsabilités administratives hospitalières

- Membre du groupe de travail "Comité de l'eau" des Hospices Civils de Lyon (depuis 2000)
- Membre du Conseil Scientifique de la plateforme NGS, Hospices Civils de Lyon (depuis 2014)
- Direction médicale d'Unités Fonctionnelles à l'Institut des Agents Infectieux : UF 24844 du CNR des légionelles et UF 24432 des analyses environnementales des légionelles (depuis 2017)
- Responsable du site IAI pour la plateforme NGS du CHU de Lyon (depuis 2019)
- Co-coordinatrice avec le Pr Bruno Lina du Work Package WP8 « Technologies innovantes - Plateforme de séquençage » de Axe de recherche IMEP (Infectiologie, Microbiologie, Epidémiologie et Prévention de l'infection) du CHU de Lyon
- Pilote pour la bactériologie du COPIL de la Plateforme PETRA (Plateforme d'Expertise technologique TRANslationnelle et transdisciplinaire) du CHU de Lyon (depuis 2022)

Responsabilités administratives universitaires

- Membre élu du conseil de Gestion de la Faculté de Médecine Lyon Nord (collège B), (2005-2009)
- Membre élu du Conseil National des Universités (CNU) – sous section 45-01, collège B (2013 – 2018)
- Coordinatrice du Collège de Bactériologie – Virologie ; Hygiène hospitalière du CHU de Lyon (coordinateur adjoint Pr Bruno Lina) (depuis 2019)
- Co-Responsable de l'enseignement de l'UE 18 Maladies Infectieuses – Microbiologie, Faculté de médecine Lyon Est avec le Pr F. Ader (depuis 2017)

- Membre de la Commission pédagogique de la Faculté de médecine Lyon Est (depuis 2017)

Responsabilités administratives nationales et européennes

- Directrice du Centre National de Référence des légionelles (depuis 2012)
- Directrice adjointe du Centre National de Référence des légionelles (2006 - 2011)
- Nomination comme contact point – laboratory expert pour la maladie des légionnaires au niveau Européen (2009)
- Présidente de l'European Study Group for *Legionella* Infection (ESGLI) (depuis 2021), et trésorière 2 mandats (2015 - 2020)
- Membre élu du Conseil d'Administration de la Société Française de Microbiologie (SFM) (depuis 2019)
- Co-responsable de la Section Bactériologie médicale de la Société Française de Microbiologie (depuis 2020)

Membre de groupes de travail sur *Legionella*

- Membre du groupe paritaire d'experts pour la mise en place d'une chaîne d'étalonnage pour le dénombrement des légionelles par PCR en temps réel dans l'environnement, groupe mise en place par le Ministère de la Santé et des Solidarités et par l'association AGLAE (Association générale des Laboratoires d'Analyse de l'Environnement). (2007-2008)
- Membre du COPIL de la Plateforme légionelles mise en place par l'AFNOR (Agence Française de Normalisation) (depuis 2007)
- Membre de la commission AFNOR de Normalisation : Détection des *Legionella* – méthode alternative, AFNOR T90E, Norme XPT 90-471 puis NFT 90-471 (depuis 2007)
- Membre du groupe de travail « détection des légionelles dans l'eau », ANSES (2010 - 2011)
- Membre du groupe de travail « Actualisation de la Mise Au Point sur la légionellose », Afsaps. (2010)
- Comité de pilotage (COPIL) Etude sur l'impact des retombées de panaches émis par les tours aéro-réfrigérantes des centres nucléaires de production d'électricité d'EDF sur la survenue de cas de légionellose (ANSES, InVS, CNR) (2010 – 2012)
- Participation à la rédaction de 3 guides européens pour la gestion des *Legionella* durant la pandémie COVID dans les établissements hospitaliers, les maisons de repos et de soins, et les grands bâtiments

Appartenance à des sociétés savantes

- Membre de la Société Française de Microbiologie (depuis 1997)
- Membre du groupe AZAY, collégiale des hospitalo-universitaires de Bactériologie – Virologie – Hygiène (depuis 2010)
- Membre de l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (depuis 2012)
- Membre de la Society for applied Microbiology (SfAM) (2016 – 2017)

Congrès : Organisation – Comité scientifique

- Responsable de l'organisation du 5th European Congress of the European Study Group of *Legionella* Infection (ESGLI) Conference, 28-30 august 2018, Lyon, France – esgli2018.univ-lyon1.fr (200 participants internationaux, 32 pays)
- Membre de Comité Scientifique : 6th European Congress of the European Study Group of *Legionella* Infection (ESGLI) Conference, Athènes, 11-12/Sept 2019
- Microbes 2021, 16ème congrès national de la SFM, 22-24 Sept 2021
- Organisation dans le cadre de ESGLI des premiers webinars du study Group avec l'aide de ESCMID (1h) ; le webinar#1 a eu le 21 avril 2021 (*Legionella* in environment), le webinar#2 est prévu le 16 Juin 2021
- Participation à la mise en place et à l'organisation dans le cadre de la 'Section Bactériologie médicale de la SFM' des webinars hebdomadaires (1h) de microbiologie clinique (bactériologie / virologie / myco-parasitologie) - Le Remic's (8 sont programmés jusqu'en Juillet 2021)

Activités de recherche

ORCID : <https://orcid.org/0000-0001-5750-0215>

Web of Science ResearcherID : [M-4551-2014](https://orcid.org/0000-0001-5750-0215)

Notre travail de recherche s'intègre entièrement dans la thématique du Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111 - CNRS UMR5308 - Université Lyon 1 - ENS de Lyon. Il concerne l'exploration de l'interaction hôte-*Legionella* et a pour but de caractériser les déterminants bactériens, de l'hôte et environnementaux impliqués dans l'acquisition et la sévérité de la légionellose. Ce travail est à l'origine de plus de 130 publications dans des revues de langue anglaise à comité de lecture.

Facteur h : 35 ; Score SIGAPS 1502

Prime d'Encadrement Doctoral et de Recherche : campagnes 2006-2010, 2010-2014, 2014-2018, 2020-2024

Grants concernant *Legionella*

Coordinateur

- AFSSET 2008-2010 - LEGIOADHER, Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la cytoadhérence de *Legionella pneumophila* aux cellules épithéliales
- FRM 2014-2017 Large-scale RNA-seq analysis of intracellularly grown *Legionella pneumophila* strains. Programme Analyse Bio-informatique pour la recherche en Biologie 2013, en collaboration avec Guy Perrière LBBE UMR5558, Lyon
- ANR/DGOS 2016-2020 PROGLEGIO, Prognostic value of microbial and host determinants for Legionnaires' disease outcome, Programme de recherche translationnelle en santé
- *Investigatrice projet européen* : ESCMID Study Group Research Grants 2018 - Evaluation of 16 assays for the qualitative detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples from patients with pneumonia

Responsabilité scientifique pour l'équipe

- Appel à Recherche Ciblée Légionelles AFSSET (2005-2007) : « Genome based epidemiology: towards the prediction of the risk related with a strain ». Coordinateur scientifique : Carmen Buchrieser Institut Pasteur Paris, Unité de Génomique des Microorganismes Pathogènes.
- Programme ANR-06-Santé-Environnement et Santé-Travail (2006-2010), LEGIOAEROPATHO, Impact of environmental factors on survival and pathogenicity of airborne *Legionella*. Coordinateur principal Jacques Frères (LCEE Poitiers), projet réalisé en collaboration avec le CSTB Marne la Vallée / DESP-EPHE Nancy).
- Projet Génoscope, 2006. Comparative genomics of pathogenic and non-pathogenic *Legionella pneumophila* to understand virulence in humans. GENOSCOPE - Centre national de séquençage, Evry. Coordinateur du projet, Carmen Buchrieser de l'Institut Pasteur de Paris
- Appel à Recherche Ciblée Légionelles 2007 AFSSET (2007 – 2009) : Rôle des amibes de l'environnement sur la colonisation, la prolifération et la virulence des bactéries du genre *Legionella*. Coordinateur principal Michel Pelandakis, réalisé en collaboration avec 2 autres équipes universitaires, Danièle Atlan (Lyon), Dominique Schneider (Grenoble)
- Appel à projet APR EST 2010 ANSES (2010-2012). Epidémiologie moléculaire et modélisation spatiale dynamique des populations de *Legionella pneumophila* dans l'environnement
- LabEx ECOFECT – EVOLVIR, Evolution of virulence and host spectrum in the emerging pathogen *Legionella pneumophila*, Appel à Projets 'Au fil de l'Eau' Co-porteur Vincent Daubin (DR) équipe Laboratoire de Biométrie et Bioévolution (LBBE, Lyon) (2017 – 2020) (Projet majoritairement assuré par E. Kay, CR de l'équipe, avec un doctorant)

Responsable adjointe : Ghislaine Descours

Ghislaine Descours s'engage à assurer la durée du mandat en cas de nomination. La lettre d'engagement est ci-dessous.



CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES LEGIONELLES

LEGIONELLES
Centre National de Référence

INSTITUT DES AGENTS INFECTIEUX
HOPITAL DE LA CROIX ROUSSE
CENTRE DE BIOLOGIE NORD – BATIMENT O
103 GRANDE RUE DE LA CROIX ROUSSE
69004 LYON

Pr Sophie JARRAUD
☎ 04 72 07 16 38
✉ sophie.jarraud@chu-lyon.fr

Dr Ghislaine DESCOURS
☎ 04 72 07 16 50
✉ ghislaine.descours@chu-lyon.fr

Dr Laetitia Beraud
☎ 04 72 07 18 44
✉ laetitia.beraud@chu-lyon.fr

Dr Camille Allam
☎ 04 72 07 16 71
✉ camille.allam@chu-lyon.fr

Dr Marine Ibranosyan
☎ 04 72 07 11 93
✉ marine.ibranosyan@chu-lyon.fr

Pr Florence Ader
☎ 04 72 07 15 60
✉ florence.ader@chu-lyon.fr

Christophe Ginevra
☎ 04 72 11 54 12
✉ christophe.ginevra@chu-lyon.fr

Lyon, 16 mai 2022

Objet : **Lettre engagement à assurer la durée du mandat**

Je soussignée Ghislaine Descours m'engage à assurer la durée du mandat en cas de nomination comme co-responsable scientifique du Centre National de Référence des Légionelles pour la mandature 2023 – 2027.

Dr Ghislaine Descours

Fonction actuelle

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier (Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie de Lyon – Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon)

Cursus

- Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier (2014), 1ère classe (2016)
- Assistante Hospitalo-Universitaire en Microbiologie (2010 – 2014)
- Interne des Hospices Civils de Lyon, DES de Biologie Médicale (2006 – 2010)
- Interne des Hospices Civils de Lyon, DES de Pharmacie Hospitalière (2005 – 2006)

Etablissements

N° d'inscription au Conseil National de l'Ordre des Pharmaciens : 00144014

N° RPPS : 10100184760 ; N° CPS : 2700738754

Adresse hospitalière

Hopital de la Croix-Rousse
Institut des Agents Infectieux
Centre de Biologie Nord - Bâtiment O
103 Grande Rue de la Croix Rousse
69004 LYON
Courriel : ghislaine.descours@chu-lyon.fr

Adresse universitaire

Equipe Legiopath – CIRI
U1111 INSERM-CNRS-UCBL-ENSL
Domaine Scientifique de la Doua, Université Lyon 1
Bat. André LWOFF, 3^{ème} étage, 10 rue Raphaël Dubois
69622 Villeurbanne
Courriel : ghislaine.descours@univ-lyon1.fr

Diplômes / Formation

- Diplôme de Doctorat d'Université, Université Claude Bernard Lyon 1, 2013
- Master 2 Recherche Ecologie Microbienne, Université Claude Bernard Lyon 1, 2011
- Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1, 2010
- Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale, Université Claude Bernard Lyon 1, 2010

Fonctions administratives hospitalières

- Membre du CNR des légionelles (depuis 2010)

Fonctions administratives universitaires

- Membre élu du Conseil d'Administration de l'Association des Enseignants de Microbiologie et d'Immunologie des Facultés de Pharmacie (AEMIP) (2018-2021)
- Membre élu de la Commission d'audition hospitalo-universitaire en Pharmacie de Lyon (depuis 2021)
- Membre de la Commission de la Formation Continue de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon (depuis 2015)
- Membre de la Commission Hospitalo-Universitaire de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon (depuis 2015)
- Membre de la Commission Scientifique de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon (depuis 2015)
- Membre de la Commission de Pédagogie de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon (depuis 2015)
- Responsable de l'épreuve de Certificat de Synthèse pharmaceutique de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon (depuis 2020)
- Responsable des UE 4.20b et de l'UE C3 Recherche de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon (2015-2020)
- Responsable de l'enseignement de l'UE 4.7 Maladies Infectieuses de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon (depuis 2015)

Appartenance à des sociétés savantes

- Membre de l'European Study Group for *Legionella* Infection (ESGLI) (depuis 2010)
- Membre de l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (depuis 2010)
- Membre de la Société Française de Microbiologie (depuis 2021)
- Membre de l'AEMIP (depuis 2010)
- Membre de l'American Society for Microbiology (ASM) (2017-2018)

Congrès

- Membre du Comité d'Organisation du 5th European Congress of the European Study Group of *Legionella* Infection (ESGLI) Conference, 2018, Lyon, France (200 participants internationaux, 32 pays)

Activités de recherche

ORCID : 0000-0001-5745-5186

Web of Science ResearcherID : M-6167-2014

29 publications dont 27 dans des revues de langue anglaise à comité de lecture

Facteur h : 10

Score SIGAPS : 324

2.2.1.2 Personnels affectés au CNR et Organigramme

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

L'organigramme fonctionnel du CNR est présenté en figure 1.

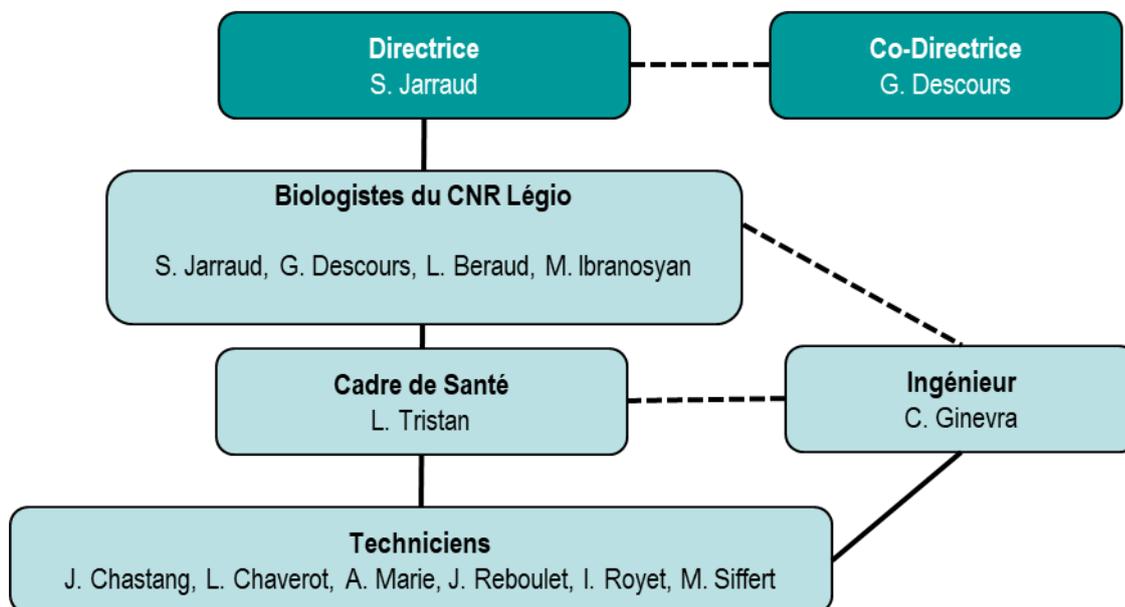


Figure 1. Organigramme fonctionnel du CNR.

Expertises – compétences. L'ensemble des personnels pour la mandature 2023-2027 est présenté en tableau 1. Les biologistes partagent l'ensemble des 4 missions du CNR (expertise, conseil, surveillance épidémiologique, alerte) et ont une expertise depuis de nombreuses années sur la thématique *Legionella* (S. Jarraud plus de 25 ans, G. Descours depuis 2010, L. Beraud depuis 2014). Marine Ibranosyan, assistante hospitalo-universitaire (AHU) du service a ses activités de recherche en lien direct avec le CNR depuis 2019 et est déjà complètement intégrée au CNR, elle remplacera C. Allam qui occupe actuellement ce poste d'AHU. C. Geneva, est ingénieur au CNR depuis 2012 et a développé une forte expertise en génomique indispensable au CNR. Concernant les techniciens, ils partagent les activités des différents secteurs du CNR notamment les postes d'identification de souches, de diagnostic, de biologie moléculaire, de typage, de détection environnementale... Les techniciens ont également une expertise de longue date (de plus de 25 ans pour certains) et l'équipe a accueilli deux nouveaux techniciens (Aurélien Marie et Jérémie Reboulet) en janvier 2021 du fait de départs à la retraite.

En plus de ces compétences, le CNR fera appel ponctuellement aux compétences d'un bio-informaticien de la plateforme GenEPII en coordination avec C. Geneva pour le développement de pipelines bioinformatiques en lien avec les activités développées par le CNR et la mise en conformité des pipelines utilisés pour l'accréditation.

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

Nom et Prénom	Fonction / qualification	Coordonnées
Sophie Jarraud	PU-PH, Institut des Agents Infectieux - Hospices Civils de Lyon, Faculté de Médecine Lyon Est, Equipe « Pathogénie des Légionelles », Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)	Tél : 04 72 07 16 38 sophie.jarraud@chu-lyon.fr
Responsable du CNR-Legio		
Ghislaine Descours	MCU-PH, Institut des Agents Infectieux - Hospices Civils de Lyon, ISPB – Faculté de Pharmacie Lyon, Equipe « Pathogénie des Légionelles », Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)	Tél : 04 72 07 16 50 ghislaine.descours@chu-lyon.fr
Responsable adjoint du CNR-Legio		
Florence Ader	PU-PH - Service des maladies infectieuses Hospices Civils de Lyon, Faculté de Médecine Lyon Est, Equipe « Pathogénie des Légionelles », Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)	Tél : 04 72 07 15 60 florence.ader@univ-lyon1.fr
Marine Ibranosyan	AHU - Institut des Agents Infectieux - Hospices Civils de Lyon, Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon-Sud Charles Mérieux, Equipe « Pathogénie des Légionelles », Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)	Tél : 04 72 07 16 71 marine.ibranosyan@chu-lyon.fr
Laetitia Beraud	PH - Institut des Agents Infectieux - Hospices Civils de Lyon,	Tél : 04 72 07 18 44 laetitia.beraud@chu-lyon.fr
Christophe Ginevra	Ingénieur (Hospices Civils de Lyon), Equipe « Pathogénie des Légionelles », Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)	Tel : 04 72 07 16 27 christophe.ginevra@chu-lyon.fr
En recrutement	Cadre de Santé, Hospices Civils de Lyon	lionel.tristan@chu-lyon.fr
Joelle Chastang Lucie Chaverot Aurélie Marie Jeremy Reboulet Isabelle Royet Marielle Siffert	Techniciens (Hospices Civils de Lyon)	
Manon Robert, Blandine Bavitot, Juliette Auffrand	Secrétaires (Hospices Civils de Lyon)	Tél : 04 72 07 11 45 Fax : 04 72 00 37 54 manon.robert@chu-lyon.fr blandine.bavitot@chu-lyon.fr juliette.auffrand@chu-lyon.fr

2.2.2 En matière d'équipements et de logistique

➤ Surface des locaux – plan

Surface des locaux - plan :

Les CNR du CHU de Lyon sont localisés à l'Institut des Agents Infectieux (IAI) dans le Centre de Biologie Nord (CBN) de l'Hôpital de la Croix Rousse. Hormis un plateau de Biochimie – Hématologie d'urgence destiné aux patients de l'hôpital de la Croix Rousse, plateau qui occupe un demi-étage du bâtiment, le reste des 5 étages du bâtiment soit environ 4500 m² est occupé par la Microbiologie :

- le R+5 de l'IAI est occupé par les laboratoires L3 (Virologie, Mycobactéries, Biotox), la virologie cellulaire, les CNR de Virologie ; la mise en place d'une plateforme de séquençage (GenEPII) a débuté en 2020 ;
- le R+4 est dévolu au plateau de Biologie Moléculaire Infectieuse (manuelle et automatisée, dont une partie génomique) ;
- le R+3 est occupé par le plateau de Bactériologie automatisée 24/24 ;
- le R+2 est occupé à moitié par le plateau de Biochimie – Hématologie 24/24 et par le plateau de Sérologie Infectieuse manuelle et automatisée ;
- le R+1 héberge le **CNR des staphylocoques**, le **CNR des Légionelles**, l'hygiène environnementale et la Parasitologie – Mycologie non automatisée.

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

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



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

➤ Principaux équipements

Du fait de l'implantation du CNR des Légionelles au sein de l'Institut des Agents Infectieux regroupant les laboratoires de bactériologie, virologie et mycologie / parasitologie de Lyon ainsi que 2 autres CNR et 1 laboratoire associé (Staphylocoques, Entérovirus et des Virus respiratoires), et de la mutualisation avec les autres secteurs du laboratoire, l'accès à de nouveaux équipements est facilité. Les principaux équipements dont dispose le CNR sont ceux d'un laboratoire de microbiologie ayant des approches moléculaires et cellulaires. Ainsi, entre les laboratoires hospitaliers et universitaires, le CNR a accès à tout un équipement technologique comme des appareils PCR temps réels (Light Cycler 1, 2 et 480, QuantStudio, et autres...), de nombreux thermocycleurs conventionnels, des extracteurs d'ADN, des hottes à flux et des PSMs, un système informatique de traitement des images électrophorétiques et d'analyse des données, des cytomètres de flux (utilisé pour étudier l'interaction hôte bactérie au niveau cellulaire), un système xCELLigence (Agilent), un système MALDI-TOF pour l'identification bactérienne (Axima Shimadzu couplé à la base de données Saramis), des ensemeurs (EasySpiral), des centrifugeuses de différentes capacités, et tout le matériel nécessaire à la stérilisation du matériel et à la décontamination.

Sur le plan plus spécifique des techniques de Next Generation Sequencing (NGS), nous avons mis en place conjointement avec les autres CNRs de l'IAI (CNR des virus respiratoires, des Enterovirus et parechovirus et des Staphylocoques) une plateforme NGS dédiée à la microbiologie (voir paragraphe 3.2.5 du bilan d'activité). Nous avons ainsi accès à des séquenceurs Illumina (NextSeq, MiSeq et Novaseq) ou nanopore (Mk1, Mk1C et GridION), des automates pour la préparation de banque (Mosquito, DragonFly Discovery, DreamPrep, Epimotion).

La plateforme de séquençage haut-débit GenEPII - Plateforme de Génomique à visée Epidémiologique des maladies Infectieuses – a été créée aux Hospices Civils de Lyon dans le cadre de la pandémie COVID pour assurer la surveillance des pathologies infectieuses émergentes (virales, bactériennes, fongiques, parasitaires). Elle a été organisée pour permettre 3 niveaux d'urgence analytique, allant d'un niveau bas débit (circuit urgent), au moyen débit (circuit routine) et jusqu'au très haut débit (circuit urgence sanitaire épidémique/endémique/pandémique comme avec le SARS-CoV2). Compte tenu du contexte pandémique actuelle, la plateforme se consacre essentiellement au séquençage du SARS-CoV-2 avec plus de 2000 séquences produites par semaine. Sur cette plateforme sont également réalisés avec des personnels dédiés le séquençage des pathogènes étudiés par les 4 CNRs hébergés par les Hospices Civils de Lyon (Staphylocoques, Légionelles, Virus respiratoires, et Entérovirus) mais aussi le séquençage des mycobactéries (Centre Régional) et des Nocardia (Laboratoire de Référence des Nocardia depuis 2022), et des virus de l'hépatite delta (HDV).

La plateforme possède également les ressources pour l'analyses et le stockage des données générées avec plusieurs serveurs de calcul et plusieurs serveurs de stockage sécurisé, le tout localisé et géré au niveau de la direction de l'informatique des Hospices Civils de Lyon (DSN). La plateforme dispose également d'un accès sécurisé à un cluster de calcul haute capacité (Université de Grenoble) et un groupe bioinformatique composé de bioinformaticiens, de biostatisticiens et de biologiste développant conjointement des outils d'analyses mutualisés pour les différents services. Le CNR a accès à cette plateforme et plusieurs applications de ces technologies sont actuellement en développement au CNR.

Concernant les moyens informatiques, outre le système de gestion du laboratoire (SGL) qui est utilisé pour l'ensemble des analyses traitées par le laboratoire de bactériologie (GLIMS), incluant celles du CNR, le laboratoire s'est doté d'un outil de gestion de base de données spécifiques pour les CNR sur une base du logiciel Bionumerics de la société Applied Maths hébergé sur des serveurs sécurisés à la DSN des Hospices Civils de Lyon.

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

Depuis le 1er janvier 2013, le CNR est adossé à l'équipe pathogénèse des légionelles (LegioPath) co-dirigée par les Pr Patricia Doublet et Sophie Jarraud. Cette recherche se développe au sein du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI, <http://ciri.inserm.fr>), un centre de recherche qui regroupe 24 équipes de recherche et 2 groupes CIRI labélisées par l'INSERM, le CNRS, l'Université Lyon1, l'Ecole Normale Supérieure de Lyon. Le CIRI, dirigé par le Dr François-Loïc Cosset et co-dirigé par le Pr François Vandenesch, regroupe des chercheurs de 3 spécialités, Bactériologie, Virologie et Immunologie, qui travaillent ensemble avec pour objectif principal la compréhension des interactions entre les microbes et leurs hôtes afin de mieux lutter contre les maladies infectieuses.

L'équipe « Pathogénèse des Légionelles » est actuellement constituée de 10 chercheurs et enseignants-chercheurs, de 1 technicien, 5 doctorants et 2 Post-Doc (voir ci-dessous). Elle a obtenu une évaluation très positive du Conseil Scientifique Consultatif (SAB : Scientific Advisory Board) et a été évaluée favorablement par le Haut Conseil de l'évaluation de la recherche et de l'enseignement supérieur (HCERES) en 2020 (selon les 4 critères évalués : 1 excellent, 3 very good to excellent).

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

L'objectif final de l'équipe est de caractériser **les déterminants bactériens, de l'hôte et environnementaux de l'acquisition et de la sévérité de la légionellose** afin de contribuer à une prise en charge meilleure et plus efficace des patients. Pour ce faire, l'équipe bénéficie des données biologiques et cliniques du CNR des Légionelles et nous développons une stratégie intégrée incluant l'étude des mécanismes moléculaires des interactions bactéries-cellules hôtes, la physiopathologie de la légionellose sur des modèles sophistiqués de cellules/tissus humains et des approches de microbiologie clinique de la légionellose humaine. Concernant la sévérité de la légionellose, nos objectifs sont d'identifier des déterminants bactériens spécifiques de pathogénicité (au niveau génomique et transcritomique) et

caractériser la réponse immune de l'hôte. En collaboration, nous intégrons également certains paramètres environnementaux tels que la pollution dans notre projet de recherche.

Tableau 2. Composition de l'équipe Pathogénie des légionelles – équipe #5 du CIRI.

E05 Pathogénèse des légionelles LegioPath DOUBLET Patricia - JARRAUD Sophie			
ADAMS WARD	Xanthe	Doctorant	UCBL
ADER*	Florence	PU-PH	UCBL/HCL
ALLAM*	Camille	Doctorant	HCL
ALLOMBERT-GIRIN	Julie	Ch. Contr.	UCBL
ANDREA	Claire	TCH	UCBL
BAILO	Nathalie	AI	CNRS
BOUGNON	Juliette	Doctorant	UCBL
CHAPALAIN	Annelise	MCU	UCBL
CONRAD	Anne	Doctorant	UCBL
DESCOURS*	Ghislaine	MCU-PH	UCBL/HCL
DOUBLET-DAR	Patricia	PU	UCBL
DUBOIS	Oceane	Stagiaire	INSERM
GILBERT	Christophe	MCU	UCBL
GINEVRA*	Christophe	IH	HCL
JARRAUD*	Sophie	PU-PH	UCBL/HCL
KAY	Elisabeth	CR	CNRS
PILLON	Margaux	Doctorant	UCBL
VIANNEY	Anne	MCU	UCBL
ZOUED	Abdelrahim	Ch. Contr.	UCBL

* Membres du CNR des légionelles

La distance avec le site hospitalier et notre équipe de recherche LEGIOPATH au Domaine Scientifique de la Doua, Université Lyon 1 est de 3,5 km. Le projet du CIRI est de regrouper les équipes de l'unité sur le site de Gerland. L'équipe devrait déménager dans des locaux neufs fin 2022. La distance avec le site hospitalier sera alors de 7,5 km mais avec une facilité d'accès.

2.4 LES CAPACITES TECHNIQUES DU LABORATOIRE

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

Méthodes pour le diagnostic des légionelloses

- **Mise en culture** de prélèvements pulmonaires sur des milieux spécifiques (BCYE, BMPA, MWY)
 - * Descours G, Cassier P, Forey F, Ginevra C, Etienne J, Lina G, Jarraud S. J Microbiol Methods. 2014, 98: 119-21.
- **Co-culture** des prélèvements pulmonaires sur **tapis ambien** réalisée en milieu PAS (Page's amoebic saline) ou par la technique *Amoebae Plate Test* (Test APT) développée par le CNR et qui est la méthode utilisée depuis 2015.
 - * Descours G, Suet A, Ginevra C, Campese C, Slimani S, Ader F, Che D, Lina G, Jarraud S. J Clin Microbiol. 2012 Feb 8.
 - * H. Hanneltel, J.V. Reynaud, C. Kolenda, A.G. Ranc, L. Beraud, C. Ginevra, S. Jarraud, G. Descours. Communication orale, ESGLI 2016, Amsterdam, Pays-Bas.
 - * Descours G, Hanneltel H, Reynaud JV, Ranc AG, Beraud L, Kolenda C, et al. Adaptation of Amoeba Plate Test To Recover Legionella Strains from Clinical Samples. Carroll KC, editor. Journal of Clinical Microbiology . 2018 Feb 21;56(5).

- **Détection d'antigènes dans les urines** par immunochromatographie sur membrane (BinaxNOW *Legionella*[®], Sofia[®], ou autres) et par ELISA (EIA Binax, ou autres).
 - * Chauffage des urines à 100°C pendant 5 min suivi d'une centrifugation à 1000 g pendant 15 min ou 10000 g pendant 5 min avant analyse pour éliminer les faux positifs (dénaturation protéique) quel que soit le test utilisé.
 - * Concentration des urines par centrifugation à l'aide des tubes Amikon Ultra-4 Ultracel-10k (Millipore[®])
- **Sérodiagnostic** par ELISA (kit commercialisé Captia TrinityBiotech) ou par immunofluorescence indirecte à l'aide d'antigènes préparés par le CNR selon la méthode de Taylor *et al.* sur sacs vitellins d'embryons de poulet (Public Health Laboratory, Colindale, UK). Des antigènes polyvalents et monovalents de l'ensemble des sérogroupes et des espèces de *Legionella* ont ainsi été préparés par le CNR.
- **PCR sur prélèvements pulmonaires**, sérum, sang sur EDTA ou autres prélèvements pathologiques :
 - * Utilisation du réactif Diagénode (*Legionella species and Legionella pneumophila* Real-time PCR)
 - * PCR en temps réel multiplexe, développée par le groupe Européen ESGLI (Mentasti *et al.* ; Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015). Cette PCR cible une région spécifique de l'espèce *Legionella pneumophila* d'une part et une région spécifique du séro groupe 1 de cette même espèce permettant son identification simultanément à la détection de l'espèce.
 - * PCR simplex spécifique du séro groupe 1 de *L. pneumophila* (Lp1) applicable aux prélèvements environnementaux et aux prélèvements cliniques
 - Méroult N, Rusniok C, Jarraud S, Gomez-Valero L, Cazalet C, Maurin M, Brachet E, Aegerter P, Gaillard JL, Etienne J, Herrmann JL; the DELPH-I group, Lawrence C, Buchrieser C. Appl Environ Microbiol. 2011;77:1708-17.
 - * PCR universelle 16S pour les produits pathologiques provenant de sites habituellement stériles.
 - Adaptée de Chometon S, Benito Y, Chaker M, Boisset S, Ploton C, Bérard J, Vandenesch F, Freydière AM. Pediatr Infect Dis J, 2..7 ;26(5) :377-81.

Méthodes d'identification des légionelles

Sur prélèvements

- * PCR-séquençage de la région intergénique 23S-5S pour identifier les espèces de *Legionella non pneumophila*
 - Grattard F, Ginevra C, Riffard S, Ros A, Jarraud S, Etienne J, Pozzetto B. Microbes Infect. 2006;8:73-83.

Dans le cas d'échec du séquençage Sanger (lié à de l'amplification non spécifique ou à la présence de plusieurs espèces de *Legionella* dans l'échantillon), cette même région est amplifiée par PCR en point final avec une taq haute fidélité et séquencée par NGS.

Sur souches

- **Identification phénotypique des sérogroupes des *L. pneumophila*** par immunofluorescence ou ELISA à l'aide des Ac monoclonaux de Dresden (mise à disposition par Christian Lück, CNR des Légionelles, Dresden, Allemagne) ; agglutination de particules de latex sensibilisés à l'aide de réactifs commercialisés (Oxoid, Prolab) ; immunofluorescence directe grâce aux immun-sérums polyclonaux de lapin préparés par le CNR de toutes les espèces et sérogroupes de légionelles
 - Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. Methods Mol. Biol. 2013; 954:119-48.
- **Identification génotypique des *Legionella non pneumophila*** par WGS et Average Nucleotide Identity (ANI).
- Identification des *Legionella* par la méthode **MALDI-TOF-MS**
 - Le CNR dispose actuellement de MALDI-TOF-MS (base VITEK MS sous la version 3.2)
 - * Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, Flaudrops C, Bedotto M, Couderc C, Etienne J, Fournier PE. J Med Microbiol. 2010;59:273-84.
 - * Ginevra C, Dauwalder O, Baida N, Meugnier H, Freydière AM, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. Communication affichée, 28^{ème} RICAI, 2009, Paris.
 - * Dauwalder O, Ottaviani, R, Maffre I, Miclot A, De Respini S, Monnin V, Mailler S, Welker M, Durand G, Gaia V, Girard V, Jarraud S. Validation of the VITEK[®] MS IVD and RUO databases for *Legionella* species identification. Communication affichée, ESGLI Meeting, London, UK, september 2015.

Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques

- Détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices) par microdilution en milieu liquide LGM

* Vandewalle M, Massip C, Descours G, Charavit J, Chastang J, Billy PA, Boisset S, Lina G, Maurin M, Jarraud S, Ginevra C. MIC distribution among wild-type strains of *Legionella pneumophila* identifies a subpopulation with reduced susceptibility to macrolides owing to efflux pump genes, IJAA, 2017.

* Guidance document on *Legionella* susceptibility testing – version 2, EUCAST, May 2021.

- Détection des mutations associées à une résistance aux fluoroquinolones, aux macrolides et à la rifampicine pour l'ensemble des souches d'origine clinique et environnementale à partir des données de WGS par un pipeline « maison » dédié
 - * Ginevra C, Beraud L, Bentayeb H, Allam C, Chastang J, Ibranosyan M, Decroix V, Jarraud S, Descours G. *Legionella pneumophila* antibiotic resistance: from myth to reality. Mini-oral flash session, 32nd ECCMID, Lisbon, Portugal, April 2022.
- Détection des mutations associées à une résistance aux fluoroquinolones, aux macrolides et à la rifampicine par amplifications des gènes cibles par PCR en point final et/ou en temps réel (gènes *gyrA*, *rrl*, *rplD*, *rplV* et *rpoB* respectivement) suivies d'un séquençage Sanger; PCR réalisables sur souche ou directement sur prélèvement.
 - * Descours G, Ginevra C, Jacotin N, Forey F, Chastang J, Kay E, Etienne J, Lina G, Doublet P, Jarraud S. Ribosomal mutations conferring macrolide resistance in *Legionella pneumophila*. AAC. 2017;61(3).
 - * Descours G, Jacotin N, Forey F, Chastang J, Etienne J, Lina G, Ginevra C, Jarraud S. Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: from molecular characterization to clinical investigations. Communication affichée, 24th ECCMID, Barcelone, Espagne, June 2014.
 - * Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebel C, Timsit JF, Schneider D, Maurin M. Hidden selection of bacterial resistance to fluoroquinolones *in vivo*: the case of *Legionella pneumophila* and Humans. EBioMedicine. 2015 Jul 17;2(9):1179-85.
 - * Billy P.A. Développement d'un outil de détection des sous-populations résistantes aux fluoroquinolones, aux macrolides et à la rifampicine par séquençage ciblé haut débit chez *Legionella pneumophila*. Thèse d'exercice en Médecine, sous la direction du Dr S. Jarraud et Christophe Ginevra, Octobre 2015, Lyon.
- Identification des sous populations résistantes aux macrolides, fluoroquinolones et rifampicine par technique de séquençage ciblé haut débit.
 - * Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebel C, Timsit JF, Schneider D, Maurin M. Hidden selection of bacterial resistance to fluoroquinolones *in vivo*: the case of *Legionella pneumophila* and Humans. EBioMedicine. 2015 Jul 17;2(9):1179-85.

Méthode de recherche de légionelles dans l'environnement

- Culture de prélèvement d'eau selon la norme NFT90-431 (Accréditation n°1-2324)
- Culture de matrice complexe tels que compost, terre, boues de lagunes d'épuration, etc
- Culture de prélèvements issus d'appareil d'oxygénothérapie
- PCR quantitative en temps réel selon la norme NFT90-471 : PCR quantitative détectant *L. pneumophila* et *Legionella* spp. avec un système commercialisé, le GeneCycler (GeneCycler®) (Accréditation n°1-2324)
 - * Joly P, Falconnet PA, Andre J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, Maurin M, Etienne J, Jarraud S. Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation. Appl Environ Microbiol. 2006;72:2801-8.
 - * Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, Andre J, Festoc G, Delabre K, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. Real-time PCR detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. Appl Environ Microbiol. 2007;73:1452-6.
- PCR quantitative par ddPCR
 - * Baume M, Cariou A, Leveau A, Fessy N, Pastori F, Jarraud S, Pierre S. Quantification of *Legionella* DNA certified reference material by digital droplet PCR. J Microbiol Methods. 2019 Feb;157:50-53.

Le CNR est accrédité pour la détection des *Legionella* dans les eaux propres par culture et PCR selon la norme NF EN ISO 17025 depuis juillet 2012 (accréditation COFRAC n°1-2423).

Détection et quantification des bactéries viables

- Quantification de l'adhésion et de la multiplication des légionelles
Par différentes méthodologies (microscopique, TECAN, PCR, cultivabilité) sur différents types cellulaires (U937, A549, amibes...)

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

Méthodes appliquées sur souches

- Séquençage du génome entier (Whole Genome Sequencing, WGS) applicable sur souche d'origine clinique et souche environnementale. La préparation des banques est réalisée à l'aide du kit DNAPrep, puis elles sont séquencées en paired-end 2x150pb, sur le séquenceur NextSeq (Illumina) ou NovaSeq de la plateforme GenEPII de l'IAI.
Interprétation : un script du laboratoire écrit sous nextflow et utilisant des images singularity est utilisé pour les analyses de l'ensemble des souches séquencées. Il comprend en plus de différentes mesures de qualité :
 - o La détermination du ST sur la base des 7 gènes classiquement utilisés pour la méthode de référence (PCR + séquençage Sanger) ;
 - o La détermination du cgMLST (schéma de 50 gènes standardisé au niveau international en Août 2018)
 - o La recherche de la pompe à efflux LpeAB ;
 - o La recherche de mutations associées à la résistance aux antibiotiques utilisés en thérapeutique ;
 - o La recherche du gène *lag* (facteur associé à une prévalence clinique plus importante des souches).Pour la comparaison plus fine de souches clonales, nous réalisons une analyse phylogénétique basée sur la cartographie des Single Nucleotide polymorphism (SNP) par rapport à une souche de référence du même fond génétique (Script du laboratoire utilisant Snippy).
Une analyse par cgMLST ad hoc peut être réalisée en complément de l'analyse phylogénétique
Les génomes de certaines souches d'intérêt sont finis par assemblage hybride illumina / nanopore. Pour ce faire les librairies sont préparées *via* le rapid barcoding kit de nanoporetech, puis séquencées sur des flowcells 9.4.1 *via* un séquenceur GridION. En 2021, des essais préliminaires de séquençage par la nouvelle chimie Q20+ sur les flowcells R10.4 ont été réalisés.

Méthodes disponibles mais de moins en moins appliquées du fait de l'étendue des données disponibles par WGS :

- « *Sequence Based Typing* » (SBT), méthode de référence Européenne, correspondant à une amplification et à un séquençage de 7 gènes (www.ewgli.com)
- Typage phénotypique par immunofluorescence réalisé à l'aide d'un panel d'anticorps monoclonaux (mAbs) de Dresden de 24 mAbs permettant le sous-groupage des *L. pneumophila* séro-groupe 1 en 9 sous-groupes (souche Philadelphia, Knoxville, Olda, Oxford, etc.) : la disponibilité des Ac n'est plus assurée de façon continue.
- Analyse des profils de migration de l'ADN génomique (arbitrary-primed PCR, AP-PCR adaptée de F. Grattard *et al* ... JCM 1996, PFGE)
- Identification des isolats porteurs du gène *lag-1* par PCR

Méthodes appliquées sur prélèvements cliniques ou sur échantillons environnementaux

- Nested-SBT : la technique de SBT peut être appliquée directement sur prélèvement clinique en s'affranchissant de l'isolement de souches. Cette méthode a été développée par le CNR. Le protocole est maintenant disponible sur le site de l'HPA (Health Public Agency).
 - * [Ginevra C](#), Lopez M, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M. J Clin Microbiol. 2009;47:981-7.
- PCR spécifiques des clones ST1 et ST47 applicables sur souches ou prélèvements
 - * [Ginevra C](#), Chastang J, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). Clin Microbiol Infect. 2020 Apr;26(4):514.e1-514.e6.
 - * Mentasti M, Cassier P, David S, Ginevra C, Gomez-Valero L, Underwood A, Afshar B, Etienne J, Parkhill J, Chalker V, Buchrieser C, Harrison TG, Jarraud S; ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). Clin Microbiol Infect. 2017 Apr;23(4):264.e1-264.e9

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

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

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

Mode de constitution

La collection est actuellement constituée par :

- l'envoi systématique des souches d'origine clinique pour typage (circulaire du 11 juillet 2005) ;
- l'envoi des prélèvements pulmonaires (1) en présence d'un diagnostic de légionellose (Ag urinaire ou PCR positive), (2) en présence d'une culture positive (envoi avec la souche) et (3) si le laboratoire ne réalise pas la culture ou la PCR ; cet envoi peut être demandé par l'ARS lors d'une investigation épidémiologique (Risque lié aux légionelles – Guide d'investigation et d'aide à la gestion, Haut Conseil de Santé Publique, 2013);
- les prélèvements et les souches de légionelles isolées de patients en échec thérapeutique peuvent être adressés au CNR pour une étude de la sensibilité aux antibiotiques ;
- les sérums ayant une positivité lors du screening en ELISA ou pour confirmation du titre (en accord avec Santé publique France) ;
- les urines nécessitant une expertise par le CNR.

Concernant l'environnement, par :

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

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

Collection de souches :

- souches de référence inscrites à l'ATCC soit 41 *L. pneumophila* et 56 *Legionella non pneumophila*
- souches de référence européennes du groupe EWGLI parfaitement caractérisées par différents marqueurs moléculaires (AFLP, PFGE, SBT, AP-PCR) (n=109 souches)
- souches d'origine clinique et environnementale caractérisées par leur identification phénotypique, leur profil en champ pulsé, leur profil en Sequence Based Typing ou en AP-PCR (n=35 665 souches)
- souches d'origine clinique et environnementale séquençées (n=3046)

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

Collection d'immun-sérums produits à partir des souches de référence chez le lapin : plus de 4000.

Collection de sérums de patients : près de 9500.

Collection de prélèvements pulmonaires de patients atteints de légionellose : plus de 8000

Collection d'urines de patients atteints de légionellose : plus de 1000

Tableau 3. Collections de souches, sérums et autres prélèvements au CNR des Légionelles.

Collection ou stockage échantillons	Nombre approximatif d'échantillons	Conditions de conservation température
Sérums	9476	-20°C
Souches patients	7940	-20°C et -80°C
Souches environnementales	29675	-20°C et -80°C
Souches de référence	206	-20°C et -80°C
Sérums de lapins immunisés	4 316	-20°C

Antigènes produits pour le sérodiagnostic	200	4°C et -20°C
Prélèvements pulmonaires (LBA, crachats, aspirations...)	8275	-20°C
Urines	1351	-20°C
ADN (prélèvements pulmonaires)	6410	-20°C

Les conservations de plusieurs aliquots d'un même échantillon ou souche sont réalisées dans des congélateurs différents.

2.4.3.2 Conditions de stockage

Le stockage est réalisé en différentes conditions (-20°C et -80°C) et dans différents lieux de l'IAI en fonction de la fréquence d'utilisation du matériel stocké, à l'étage du CNR (principalement à -20°C), au sous-sol de l'IAI dans une pièce de stockage (4 congélateurs -20°C et 2 congélateurs -80°C) ou hors bâtiment pour les ressources dites « mortes » dans un bâtiment prévu pour le stockage délocalisé (congélateur -20°C).

L'ensemble des congélateurs -80°C est placé sous surveillance par sondes type SPY (logiciel SIRIUS de la société JRI). Concernant les congélateurs -20°C, ils sont placés sous surveillance SPY s'ils sont délocalisés ou critiques, alors que d'autres sont suivis par des relevés de température classique. La surveillance est effectuée par 7 personnes avec un planning hebdomadaire et une surveillance quotidienne du lundi au vendredi).

Collection de souches :

Toutes les souches d'origine clinique sont conservées sans délai de temps. Les souches reçues d'un laboratoire partenaire sont conservées en triplicat, en émulsion sur billes (1 à -20°C et 1 à -80°C) et 1 émulsion en sang de mouton (-80°C). Pour les souches isolées au CNR, jusqu'à 5 isolats sont conservés par échantillon clinique indéfiniment. Toutes les souches d'origine environnementale sont conservées sans délai (2 émulsions sur billes à -20°C et -80°C).

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

Collection de sérums et urines :

Les sérums et urines positifs ou cliniquement intéressants sont conservés sans délai de façon systématique depuis 2009. Si négatifs, ces échantillons sont conservés 1 an.

Collection des prélèvements pulmonaires, hémocultures, biopsies etc :

Ces prélèvements sont conservés indéfiniment à -20°C en présence d'un diagnostic positif (AgU positif et/ou PCR et/ou culture positive). Les ADN extraits des prélèvements cliniques et des souches sont également conservés à -20°C indéfiniment.

2.4.3.3 Conditions de mise à disposition

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

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

Ces collections sont accessibles gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition) après accord et signature de la lettre d'agrément pour le transfert du matériel du CNR des légionelles qui figure en annexe 6.

Pour les laboratoires ou sociétés privées ayant obtenu l'autorisation d'activité d'importation d'échantillons biologiques humains destinés à la recherche, la session des prélèvements anonymisés est possible selon la réglementation actuellement en vigueur et après accord et signature de la lettre d'agrément pour le transfert du matériel du CNR des légionelles qui figure en annexe 6.

2.4.4 Bases de données de séquences

- Dans des bases de données fermées (nationales ou internationales)

Les données brutes sont stockées sur un serveur sécurisé des services informatiques des HCL. Une partie des données fastq et fasta (sans metadata) ont été déposées dans une base de données internationale fermée dans le cadre du développement du cgMLST.

- Dans des bases de données publiques (ENA par exemple) avec ou sans metadata associées

Les données déposées dans le cadre du développement du cgMLST seront déposées dans une base de données publique (ENA et/ou NCBI) dans le cadre de la publication de ce travail.

Les données déposées dans le cadre de la publication d'investigations particulières sont déposées dans une base de données publique (ENA et/ou NCBI) préalablement à chaque publication. Plus de 155 génomes séquencés sont disponibles.

Tableau 4. Numéros d'accèsion des différentes études déposées à l'ENA.

Primary Accession	Secondary Accession	Title
PRJEB51253	ERP135864	Detection of Lp1 macrolide-resistant isolates by Whole genome sequencing
PRJEB40106	ERP123705	Case report of a human pneumonia due to Legionella sainthelensi
PRJEB33700	ERP116513	Regulation of Dot-Icm effectors translocation by T4SS GGDEF-EAL proteins in Legionella pneumophila
PRJEB32615	ERP115316	Transmission of Legionnaires' disease through toilets flushing
PRJEB31835	ERP114442	Diverse conjugative elements silence natural transformation in Legionella species
PRJEB15241	ERP016951	MIC distribution among wild-type strains of Legionella pneumophila identify a subpopulation with red [...]
PRJEB14949	ERP016630	Legionella pneumophila Macrolides resistance

3 ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES (2017 - 2021)

Remerciements

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

Nous remercions Santé publique France et particulièrement :

Christine Campese, Daniel Levy-Bruhl, Isabelle Parent, Sibylle Bernard-Stoecklin, Catherine Maine, Yann Savitch.

Les membres du CNR des légionelles ayant participé à ces activités de 2017 à 2021 :

Responsable : Sophie Jarraud

Responsable adjoint : Gérard Lina

Biologistes : Ghislaine Descours, Laetitia Béraud, Anne-Gaëlle Ranc, Camille Allam, Marine Ibranosyan

Ingénieur : Christophe Ginevra

Ingénieure Qualité : Maud Baume

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

Secrétaires : Isabelle Bregeron, Hafida Ben Hadj Ali, Manon Robert, Blandine Bavitot, Juliette Auffrand, Imane Mohammadi, Yamina Lakehal

3.1 RESUME DES ACTIVITES (2017-2021)

Faits marquants au cours des 5 dernières années

Sur la période 2017 – 2021, le CNR a observé une évolution des techniques diagnostiques avec un déploiement fort des trousse de diagnostic syndromique dans les laboratoires français. En 2021, la PCR représentait 16% des diagnostics en France ; elle constituait la seule technique diagnostique pour 4,4% d'entre eux. Ces changements de pratique ont contribué à **une augmentation de la détection des cas de légionellose à *L. pneumophila* de séro groupe non 1.**

La période 2017-2021 a également été marquée par une **augmentation (+47%) du nombre d'isolats cliniques expertisés** au CNR, reflet :

- d'une incidence des légionelloses élevée par rapport à la période précédente : nombre moyen annuel de 1800 cas sur la période 2017-2021, contre 1300 cas annuels sur la période 2012-2016 (+39%) ;
- d'un envoi plus systématique de prélèvements pour mise en culture au CNR (+ 110 %).

L'isolement des souches d'origine clinique reste une priorité pour le CNR. Il permet la réalisation des investigations épidémiologiques, une meilleure connaissance des clones majoritaires responsables d'infection chez l'Homme, et une meilleure compréhension de la maladie. Néanmoins, **une souche est isolée dans seulement 25 % des cas de légionellose diagnostiqués.** Ce chiffre reste stable depuis ces dix dernières années et met en avant la nécessité de développer des techniques plus performantes pour l'isolement de souches.

De façon corrélée, le **nombre d'investigations** à la demande de l'ARS est resté stable sur la période 2017-2021 et **limité à 3% des cas.** Pourtant, les investigations ont permis d'**identifier la source de contamination dans plus de 75% des cas**, valeur supérieure à la période précédente pour laquelle seules 54% des investigations étaient positives. Le rôle des domiciles comme source de contamination reste peu investigué. L'étude LEGIODOM proposée pour la prochaine mandature pourrait permettre de mieux caractériser leur rôle.

La mandature 2017-2021 du CNR des Légionelles a plus particulièrement été marquée par deux événements épidémiques majeurs :

- identification de la **1^{ère} épidémie de fièvre de Pontiac** à *L. bozemanii* à la frontière franco-belge en juillet 2017 ; cette épidémie a impliqué plus d'une centaine de patients, dont 76 français ; 130 échantillons de patients, principalement sériques, ont été analysés au CNR et ont mis en avant la nécessité de disposer de techniques « maison » dans ce type d'investigations ;
- identification d'une **épidémie impliquant** plus de 10 personnes à Strasbourg en novembre – décembre 2019 qui relie 14 cas à une source de contamination jamais décrite jusqu'alors : **une chaufferie biomasse**, nous alertant sur de nouvelles sources potentielles de contamination n'étant pour le moment pas soumises à réglementation.

Enfin, en 2021, dans le cadre d'une investigation autour d'un cas, nous avons identifié pour la 1^{ère} fois des **souches environnementales résistantes aux macrolides** présentant une résistance de haut niveau (CMI x1000). Cette résistance a été détectée dans le cadre du screening systématique de la résistance aux anti-infectieux sur la base des données de WGS.

En effet, sur le plan technique, sur la période 2017-2021, le CNR a progressivement déployé les technologies de *Next-Generation Sequencing* (NGS), dont le *Whole Genome Sequencing* (WGS) qui a remplacé progressivement les techniques de typage phénotypiques et moléculaires utilisées historiquement au CNR. Ce déploiement est aujourd'hui facilité par un accès à la plateforme GenEPII dont le CNR a largement participé à son développement. **L'intégralité des souches cliniques et toutes les souches environnementales d'intérêt sont désormais typées par WGS.** Grace au développement de pipelines par et/ou impliquant le CNR, les données de WGS permettent aujourd'hui de réaliser le typage (ST, cgMLST), l'étude de la phylogénie des souches et de la résistance des souches aux antibiotiques dans un délai restreint, nous permettant de répondre aux alertes épidémiques.

3.2 ACTIVITES AU TITRE DE L'EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE (2017-2021)

Données du CNR

Sur le plan analytique, l'évolution des activités du CNR est résumée dans le tableau 5.

Tableau 5. Evolution de l'activité d'expertise du CNR depuis 2017.

Nombre de prélèvements ou souches	2017	2018	2019	2020	2021
EXPERTISE					
Expertise microbiologique (hors protocole de recherche clinique et évaluation de kits)					
Sérologie	842	495	349	203	341 ¹
Culture de prélèvements cliniques	451	689	648	523	941 ²
PCR sur prélèvements cliniques	254	226	213	199	637 ³
Co-culture de prélèvements pulmonaires	253	434	150	90	162 ⁴
Expertise antigènes urinaires	110	131	61	68	57
Identification de souches cliniques ⁵	377	489	441	317	564 ⁶
Expertise souches environnementales	462	472	485	320	459
Détection par culture de prélèvements d'eau complexe	2	5	6	8	16 ⁷
Détection par PCR de prélèvements d'eau complexe	6	3	4	6 ⁸	7
Détermination de la sensibilité aux antibiotiques (CMI)	8	5	103	175	174 ⁹
SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE / ALERTE					
Participation à des enquêtes épidémiologiques environnementales	65	62	58	50	64
Isolats <i>Legionella</i> analysés en PFGE ¹⁰	607	349	11	0	0
Isolats <i>Legionella</i> analysés en AP-PCR	-	-	282	195	0 ¹¹
PCR Lp1	358	459	348	210	117 ¹²
Analyse de SBT appliquée au prélèvement (Nested-SBT)	115	91	46	27	42
Isolats <i>Legionella</i> – détermination du ST (SBT ou WGS)	440	650	596	428	1451 ¹³
Isolats <i>Legionella</i> analysés en WGS	366	434	517	555	1451 ¹³

¹ parmi lesquelles 239 réalisées par technique ELISA et 138 par immunofluorescence ; correspondant à 317 patients.

² 46 cultures additionnelles en 2022 pour un protocole de recherche clinique.

³ PCR réalisées : 264 PCR *L. pneumophila* - *L. non pneumophila* (Diagénodé), 373 PCR *L. pneumophila* - *L. pneumophila* séro groupe 1 (PCR européenne ESGLI), auxquelles s'ajoutent respectivement 49 PCR diagénodé et 46 PCR européennes pour un protocole de recherche clinique.

⁴ 5 cocultures additionnelles pour un protocole de recherche clinique ; Depuis 2019, analyse réalisée uniquement sur les prélèvements présentant une contamination importante.

⁵ pour des raisons de cohérence avec les données de Santé publique France, nous avons pris en compte les souches isolées de patients pour lesquels la date de début des signes se situe dans l'année analysée et non les souches reçues et analysées au CNR.

⁶ correspondants à 230 souches reçues et 334 souches isolées au CNR.

⁷ 8 terreaux et 8 eaux d'appareil d'oxygénothérapie

⁸ 6 terreaux et 1 eau d'appareil d'oxygénothérapie

⁹ dont 162 par la technique Micronaut-S et 12 par la technique « maison »

¹⁰ Abandon de la technique en 2019 au profit du NGS et/ou de l'AP-PCR

¹¹ Abandon de la technique en 2021 au profit du NGS

¹² Modification de la technique PCR à réaliser pour le typage courant 2021 au profit de la technique ESGLI qui a provoqué une baisse des PCR Lp1

¹³ 1451 isolats dont 416 isolats d'années antérieures analysés rétrospectivement par WGS

3.2.1 Expertise dans le diagnostic des légionelloses

3.2.1.1 Evolution des tendances de la légionellose en France et de l'activité du CNR (2017-2021)

* Données nationales SpF

En 2021, 2 060 cas de légionellose ont été notifiés en France par le système de déclaration obligatoire (Cf paragraphe 3.4.1.2). Au niveau national, les données issues de la déclaration des cas sur la répartition des méthodes diagnostiques montrent la part toujours très majoritaire (~ 90%) des cas diagnostiqués par la détection des antigènes urinaires (Figure 3). Cette répartition est similaire à ce que l'on observe en Europe. La part des diagnostics réalisés par PCR continue d'augmenter, témoins de l'utilisation croissante de trousse syndromiques pour le diagnostic des pneumopathies.

Le pourcentage de cas avec un isolat disponible est de 26,8% ; il reste faible et statistiquement identique au pourcentage des cinq années précédentes (24%, $p>0,05$). Ceci reste lié à la fois à l'absence fréquente de prélèvement pulmonaire permettant la mise en culture et à la faible performance de la culture.

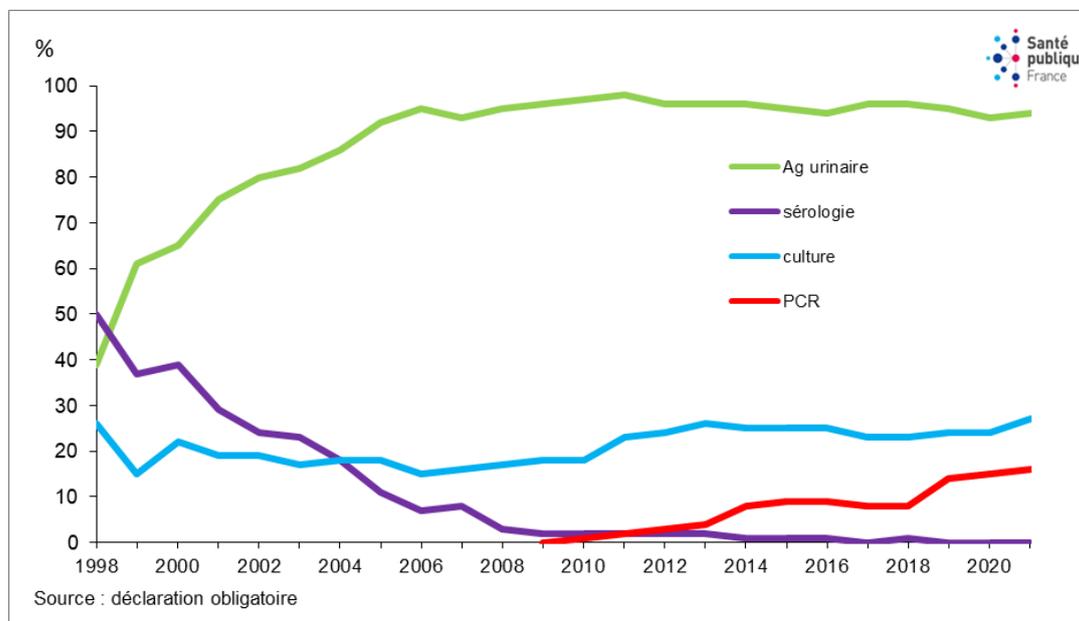


Figure 3. Répartition des méthodes diagnostiques des cas de légionelloses déclarés entre 1998 et 2021 (Données SpF).

Entre 2017 et 2021, on note une forte augmentation de l'ensemble des prélèvements et souches analysées au CNR excepté pour les sérums (2230 sérums contre 5438 pour le précédent mandat).

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

Justification de ces envois. Nous continuons, avec SpF et les ARS, à encourager les laboratoires à nous adresser un prélèvement pulmonaire en cas d'antigénurie *Legionella* et/ou de PCR positive, lorsque la culture est négative ou non réalisée dans le laboratoire d'origine. La culture des prélèvements pulmonaires présente une faible sensibilité. Cette sensibilité est nettement améliorée en multipliant et en diversifiant les milieux de culture ensemencés ce qui n'est pas réalisable par tous les laboratoires. De plus le CNR utilise une méthode de co-culture amibienne, améliorée en 2015-2016 (passage à une technique d'APT, Amoebae Plate Test) montrant de bonnes performances en complément de la culture classique en cas de forte contamination de prélèvements par de la flore oro-pharyngée (1). Entre 2017 en 2019, l'APT était réalisée systématiquement en cas de culture négative. Depuis 2019, elle est réservée aux prélèvements fortement contaminés par de la flore interférente. Ainsi en 2021, l'APT a été réalisée sur 17% des prélèvements reçus et a permis d'isoler 21 souches supplémentaires. L'obtention d'isolats cliniques est la base d'une bonne surveillance de la légionellose et est un des objectifs majeurs du CNR.

(1) Descours G, Hannellet H, Reynaud JV, Ranc AG, Beraud L, Kolenda C, et al. Adaptation of Amoeba Plate Test To Recover *Legionella* Strains from Clinical Samples. Carroll KC, editor. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018 Feb 21;56(5).

En chiffres. Depuis 2016, on note une augmentation globale du nombre de prélèvements qui nous sont adressés pour une culture (figure 4). Ceci peut s'expliquer par l'augmentation au niveau national du diagnostic des cas de légionellose, par une baisse de la réalisation de la culture dans les laboratoires partenaires et par la démocratisation des techniques de PCR dans les laboratoires de routine qui a permis une augmentation des diagnostics avec disponibilité d'échantillon pulmonaire (§ 3.2.1.1). Ce dernier point est en lien avec la baisse du nombre de prélèvements qui nous a été adressé pour une PCR. Depuis les 5 dernières années, le CNR a reçu 3252 prélèvements pulmonaires pour culture (contre 2000

au précédent mandat), 1529 pour PCR. Le nombre de mises en culture a augmenté de 109% entre 2017 (451) et 2021 (941), à l'exception de l'année 2020. Les données de la littérature et du CNR montrent que la sensibilité de la PCR est constamment supérieure à la culture. Le nombre de demande de PCR reste relativement stable entre 2017 et 2021, lié à l'implémentation des trousse diagnostiques syndromiques incluant la cible *L. pneumophila*.

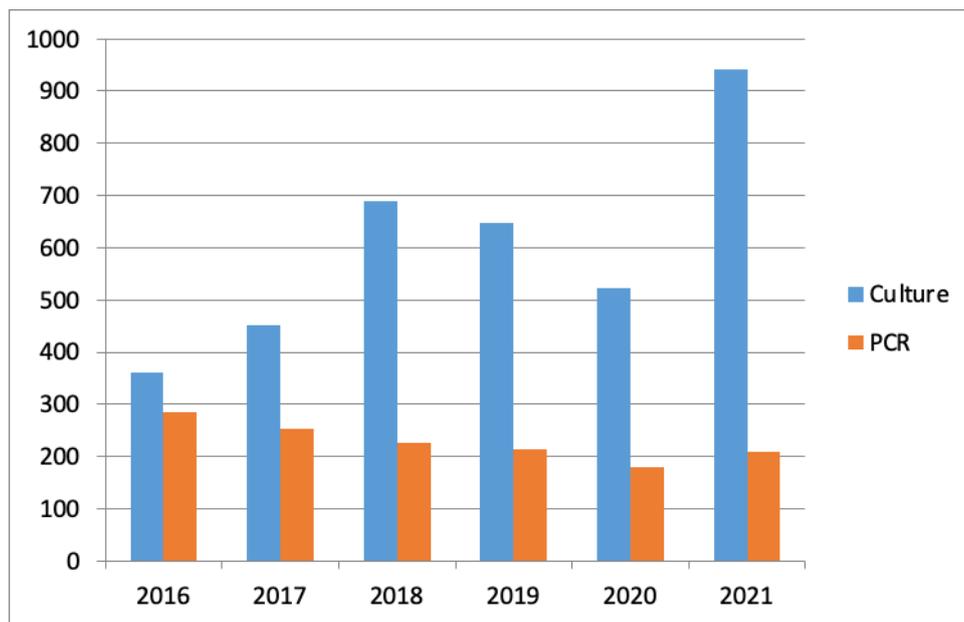


Figure 4. Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR.

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

Justification de ces envois. L'envoi des souches d'origine clinique au CNR doit être systématique (circulaire du 11 juillet 2005).

En chiffres. Nous avons reçu ou isolé 4360 souches (contre 3666) dont 2158 (contre 1311) souches cliniques et 2202 (contre 2355) environnementales. L'augmentation du nombre de souches expertisées par le CNR est en lien direct avec l'augmentation du nombre de cas diagnostiqués. Le pourcentage de cas de légionellose avec une souche isolée reste lui stable (Figure 5). En 2021, une souche a été isolée pour 26,8% de cas, ce qui est statistiquement identique au % de l'année 2020 (23,4%, $p > 0,05$) ; néanmoins cette augmentation est le reflet d'une vigilance constante des biologistes, des ARS et du CNR pour que ces mises en culture deviennent systématiques.

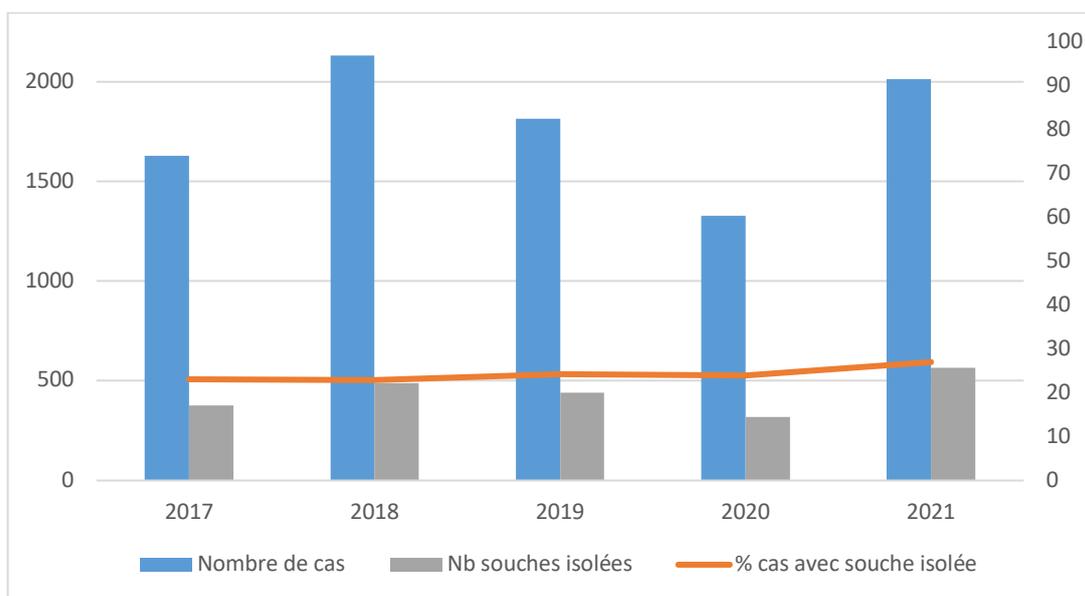


Figure 5. Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche disponible parmi l'ensemble des cas notifiés en France (données SpF).

Chaque année, les souches cliniques proviennent d'environ 80 laboratoires différents en France. Ce chiffre inférieur aux années précédentes (entre 100 et 133 partenaires sur la période 2010-2015) peut s'expliquer par une diminution de la réalisation de la culture de *Legionella* dans certains laboratoires. La répartition de nos 80 partenaires sur le territoire français est homogène et stable au cours des 5 dernières années (figure 6).

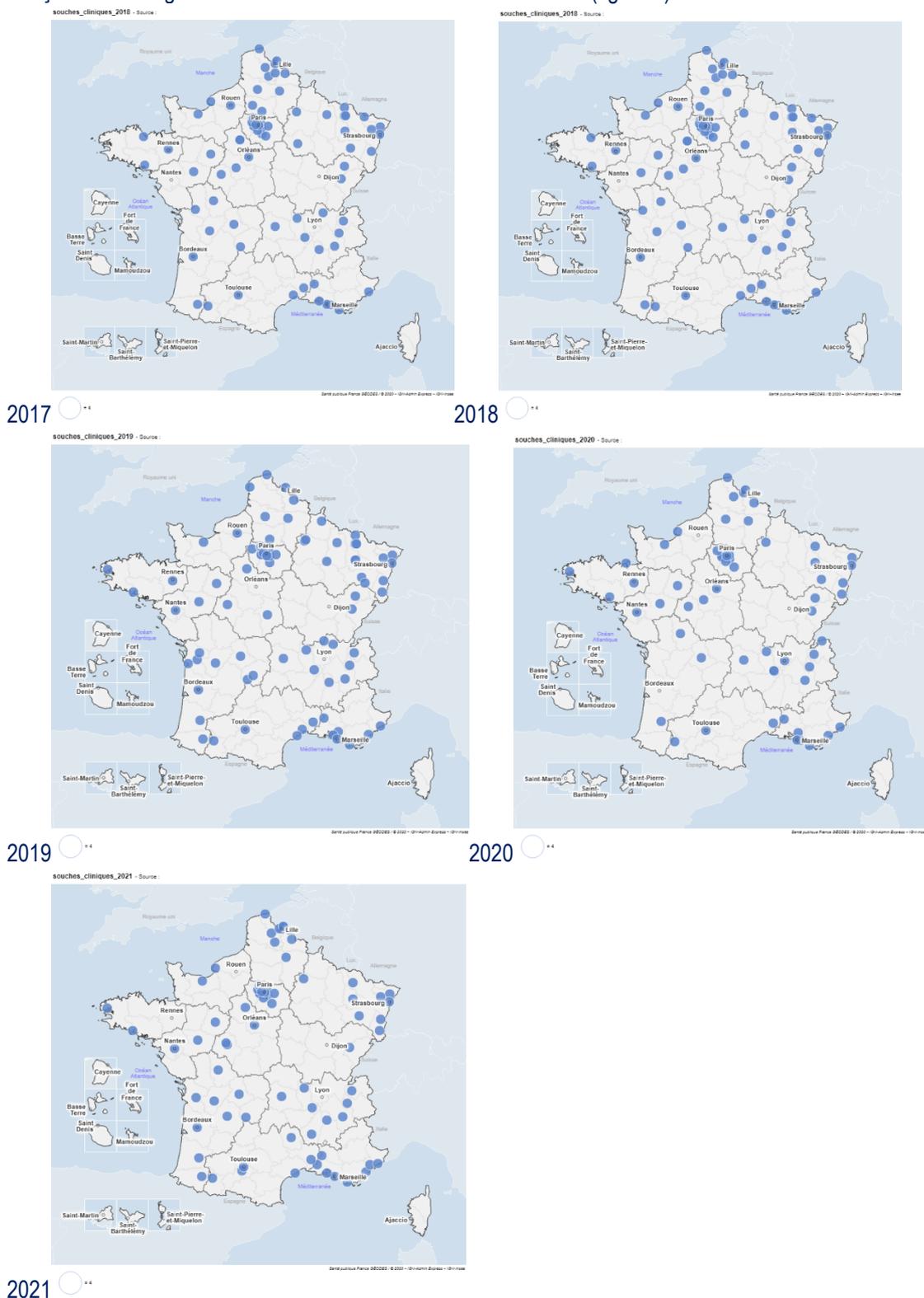


Figure 6. Répartition des partenaires nous ayant envoyé une souche clinique de *Legionella*. 2017 (N = 84); 2018 (N = 86); 2019 (N = 86); 2020 (N = 68); 2021 (N = 78)

En 2021, ces échantillons provenaient de près de 192 villes françaises (près de 80 hôpitaux et LABM, et plus de 50 laboratoires environnementaux) mais aussi des territoires d'outre-mer. Nous avons reçu des prélèvements, extraits d'ADN ou souche clinique pour 6 patients du CHR de la Réunion, 2 patients du CH de Point-à-Pitre, 1 patient du CH territorial de Nouméa. Entre 2016 et 2020, nous avons analysé 67 échantillons provenant de La Réunion, Guadeloupe, Guyane, Mayotte, la Martinique...).

Dans le même temps le nombre de partenaires nous transmettant des prélèvements pour mise en culture augmente passant de 142 en 2017 à 192 en 2021, signifiant comme supposé plus tôt que nos partenaires réalisent moins la culture de *Legionella* mais restent vigilants et concernés par le diagnostic, nous envoyant les prélèvements pour mise en culture. La répartition de nos partenaires est homogène sur le territoire (figure 7).

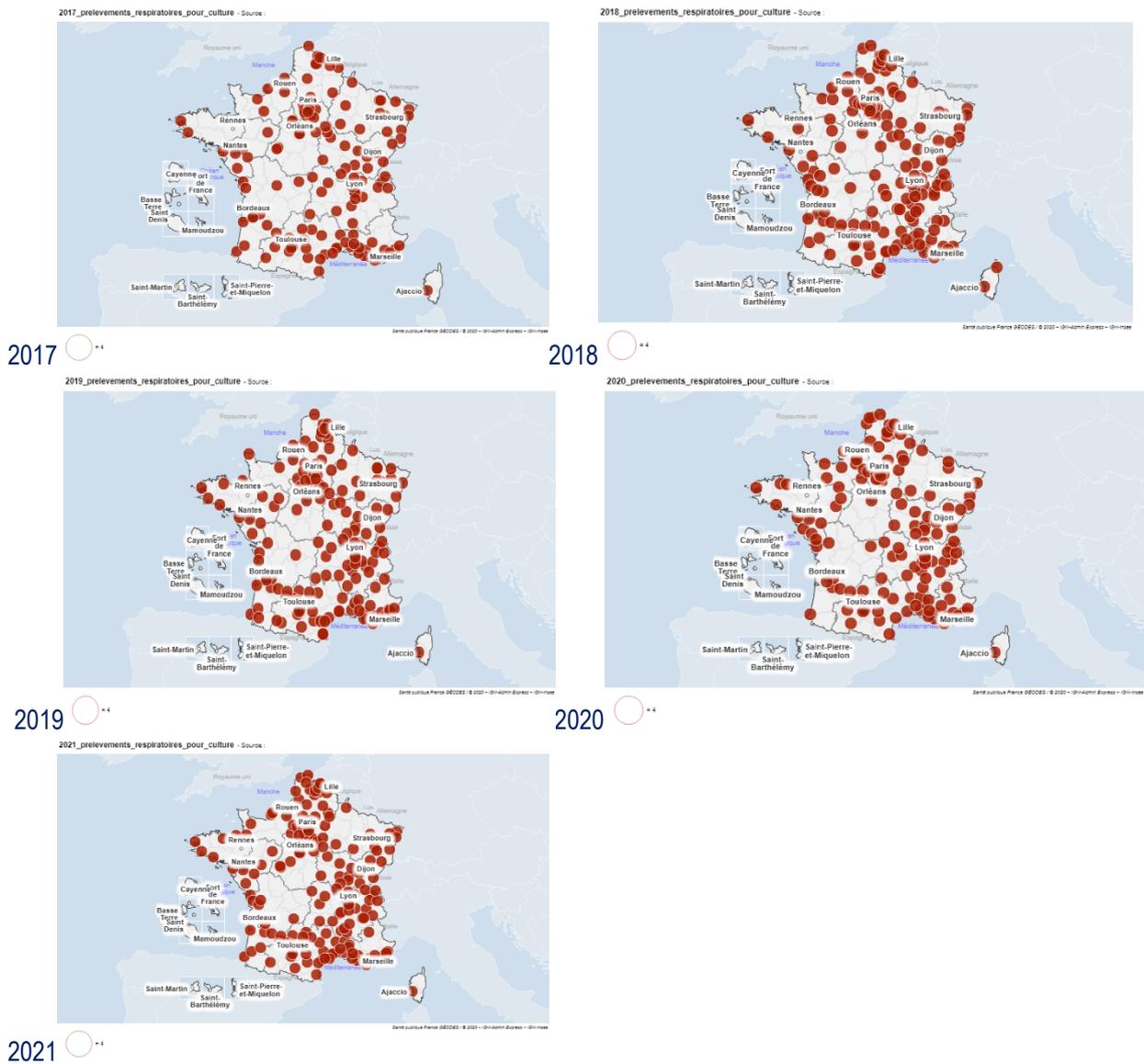
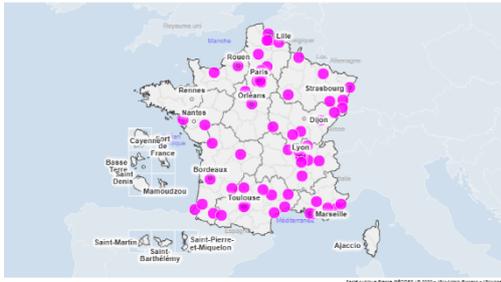


Figure 7. Répartition des partenaires nous ayant envoyé un prélèvement pour mise en culture. 2017 (N=142) ; 2018 (N=159) ; 2019 (N=175) ; 2020 (N=153) ; 2021 (N=192)

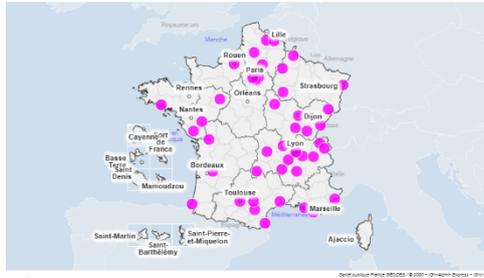
Enfin, le nombre de partenaires envoyant des prélèvements pour diagnostic diminue ces dernières années, signe du développement majeur des PCR, ne nécessitant plus systématiquement un recours au CNR. La répartition de cette petite cinquantaine de partenaires est homogène sur le territoire (figure 8)

2017_prelevements_respiratoires_pour_diagnostic - Source



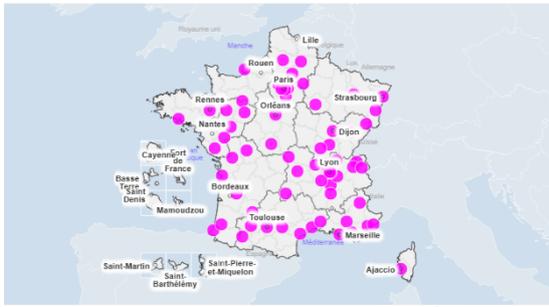
2017 ○⁶⁴

2018_prelevements_respiratoires_pour_diagnostic - Source



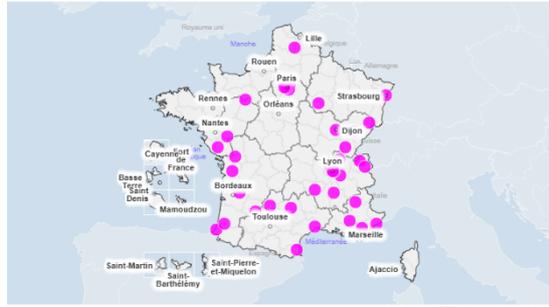
2018 ○⁵²

2019_prelevements_respiratoires_pour_diagnostic - Source



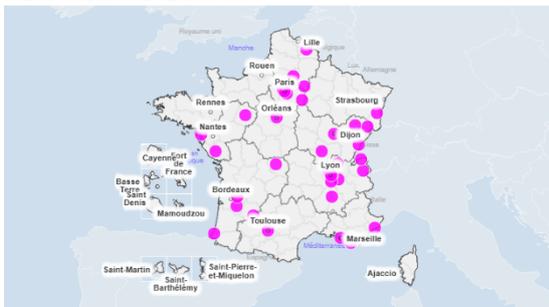
2019 ○⁷⁷

2020_prelevements_respiratoires_pour_diagnostic - Source



2020 ○⁴⁰

2021_prelevements_respiratoires_pour_diagnostic - Source



2021 ○³⁸

Figure 8. Répartition des partenaires nous ayant envoyé un prélèvement pour diagnostic. 2017 (N=64) ; 2018 (N=52) ; 2019 (N=77) ; 2020 (N=40) ; 2021 (N=38)

* Expertise des diagnostics de légionellose par antigénurie

Justification de ces envois. La veille sur les diagnostics des cas de légionellose réalisés par la détection des antigènes urinaires est importante car 90% des diagnostics sont réalisés par cette méthode. Face au développement de nouveaux kits de détection des antigènes urinaires pour lesquelles les performances sont encore mal connues, les laboratoires peuvent envoyer au CNR des échantillons d'urines pour confirmation de résultats positifs. Le CNR recommande de chauffer les urines positives (5 mn, 100°C) de manière systématique pour éliminer les réactions faussement positives. Ainsi au cours des années, des urines ont été expertisées au CNR dans les contextes suivants :

- le résultat observé dans le laboratoire expéditeur était faiblement positif ;
- le laboratoire expéditeur observait une discordance entre deux résultats, entre deux antigénuries successives, entre une antigénurie et une PCR sur prélèvement respiratoire, entre deux résultats obtenus avec des kits différents ou entre une antigénurie lue à l'œil nu et lue avec un lecteur automatisé ;
- le laboratoire expéditeur utilisait depuis peu un nouveau test pour effectuer la recherche d'antigènes urinaires *Legionella* et souhaitait confirmer ses premiers résultats ;
- le laboratoire expéditeur n'était pas encore équipé pour réaliser la confirmation des positifs après chauffage.

En chiffres : Le nombre d'urines envoyées au CNR varie de **50 à 110** par an en fonction des années. Il est fortement influencé par la mise sur le marché de nouveaux kits ou de nouvelles technologies (exemple : lecteur). Les années 2017-2018 qui ont été les plus importantes en volumétrie pour cette analyse correspondent au déploiement du lecteur Digival d'Abbott, à des changements de marchés sur plusieurs hopitaux de France et au temps de mise en place du chauffage

en systématique dans l'ensemble des laboratoires. Au fil des années, les laboratoires se sont équipés de bloc chauffant et ont appris à maîtriser leurs outils.

* Diminution des sérologies

Justification de ces envois : La place de la sérologie est limitée dans le diagnostic de légionellose. Chez les patients présentant une pneumopathie compatible avec une légionellose et si la détection des antigènes dans les urines est négative, la PCR est la méthode à privilégier, associée ou non à la culture. La sérologie ne devrait être pratiquée que si la PCR ne peut être réalisée par défaut d'échantillon respiratoire ou exceptionnellement si la PCR *L. pneumophila* est positive et que l'identification du sérotype est important. Son principal intérêt est de détecter des réponses anticorps spécifiques pour l'ensemble des sérotypes de *L. pneumophila* ce qui permet d'identifier le sérotype en cause, et potentiellement pour toutes les espèces de *Legionella*. Le Guide du HCSP de 2013 (Risque lié aux légionelles – guide d'investigation et d'aide à la gestion) précise que les sérums « des sérologies positives doivent systématiquement être envoyées au CNR-L pour identifier le sérotype de *L. pneumophila* en cause et éventuellement l'espèce non *pneumophila* ».

En chiffres : Jusqu'en 2018, le CNR réalisait plus de 800 sérologies par an. Dans le but d'améliorer la pertinence des envois de sérologies au CNR, en 2018, 44 centres hospitaliers ou centres hospitalo-universitaires répertoriés comme nous envoyant des sérums ont été contactés pour connaître la technique utilisée localement. Pour les laboratoires disposant déjà d'une technique de screening, ou sous-traitant le screening à un autre laboratoire, nous avons privilégié une confirmation par immunofluorescence sans refaire de test de dépistage. Dans les cas où la technique de dépistage n'était pas réalisée, nous avons encouragé les laboratoires à abandonner cette méthode diagnostique ou à réaliser les screening sur leur site ou encore à faire appel à des laboratoires prestataires. Cette action a permis dès la 1^{ère} année de diminuer de 41% les tests sérologiques réalisés et sur 5 ans, nous observons une diminution de 60%.

A noter en 2017, **une épidémie de fièvre de Pontiac** dans une usine belge située près de la frontière, impliquant un certain nombre de cas français et pour laquelle la sérologie a pris une place importante dans le diagnostic, les antigènes urinaires des patients étant négatifs et les patients « non sécrétants » ne permettant pas d'avoir à disposition de prélèvements respiratoires. Le CNR dispose de techniques de sérologie permettant de cibler tous les sérotypes de *L. pneumophila* et également d'autres espèces de légionelles (*L. anisa*, *L. longbeachae*, etc). Le diagnostic de la fièvre de Pontiac n'a pu être réalisé que grâce à la disponibilité d'une sérologie *L. bozemanii*.

En 2020, le CNR-L a été sollicité à titre d'expert par le département de microbiologie de l'hôpital de **Belgrade en Serbie pour réaliser une sérologie *L. pneumophila*** en IF sur 2 sérums prélevés chez un patient ayant présenté des signes cliniques de légionellose et dont le diagnostic a été posé par PCR positive (technique Filmarray). L'antigénurie était négative. La mise en culture du prélèvement respiratoire s'est avérée négative. Le laboratoire de Belgrade a donc transmis au CNR-L 2 sérums du patient qui ont permis d'objectiver une séroconversion spécifique de *L. pneumophila* sérotype 2 (titre du 1^{er} serum à 512, titre du second serum à 4096). Cette collaboration décrivant le 1^{er} cas de légionellose diagnostiqué par PCR en Serbie a abouti à la publication d'un article « Severe pneumonia caused by *Legionella pneumophila* detected by a multiplex polymerase chain reaction assay and confirmed by serology. Jovanovic M. *et al.* European Journal of Inflammation Vol 20 :1-5. »

3.2.1.2 Evaluation de méthodes, réactifs et trousse

* **Détection des antigènes urinaires**

De 2017 à 2021, le CNR a réalisé plusieurs études de performances de tests permettant la recherche d'antigénurie *Legionella*, tests commercialisés ou de prototypes, valorisés sous forme d'article ou de présentation en congrès.

- En 2017, le CNR a réalisé une évaluation du **lecteur Alere** qui a été présentée au cours du congrès international *Legionella* Conference (Rome, septembre 2017) et RICAI (Paris, décembre 2017).
- En 2017 et 2018, le CNR a évalué 2 prototypes de tests immunochromatographiques proposés par la société **Biosynex**, ainsi que le test **Monlab** commercialisé par la société Orgentec.
- En 2018, le CNR a évalué 2 tests SD Biosensor revendus par la société Orgentec, le test **standard Q®**, test immunochromatographique et le test **standard F Legionella Ag FIA®**, test immuno-chromatographique avec lecture par

immunofluorescence, ainsi que le test **ImmuView®**, test immuno-chromatographique combiné permettant la recherche à la fois de lipopolysaccharides de *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 et de *Legionella longbeachae*. Ces 2 dernières études ont été présentées au cours du congrès *Legionella* (Athènes, septembre 2019) ainsi qu'au congrès de la RICAI (Paris, décembre 2019) pour l'évaluation du test standard F *Legionella* Ag FIA®.

- Une étude débutée en 2016 sur le test **Legionella K-set®** de la société Coris a été complétée et publiée en 2019 : Souche A, et al. Comparison of Legionella K-set® and BinaxNOW® Legionella for diagnosing Legionnaires' disease on concentrated urine samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 Sep;39(9):1641-1644.

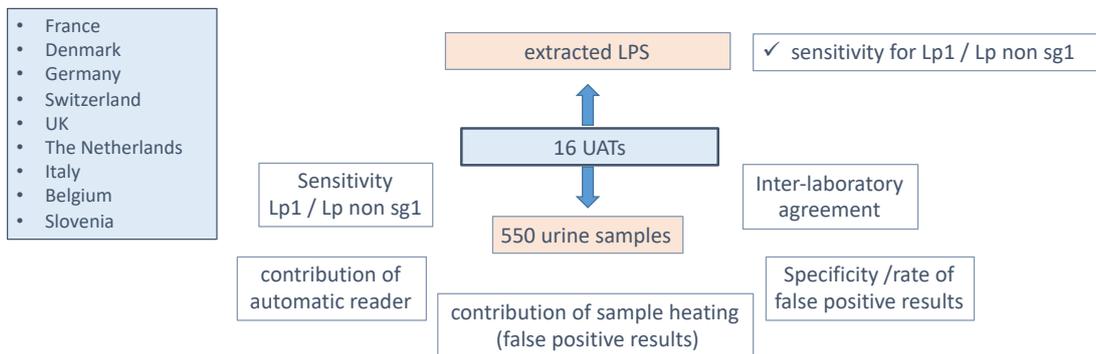
En 2019 le CNR a **coordonné une étude multicentrique européenne du groupe ESGLI** soutenue par un Grant de l'ESCMID ayant pour but l'évaluation de 16 kits de détection des antigènes urinaires de *Legionella* disponibles sur le marché européen par 9 centres de référence européens :

BinaxNOW® *Legionella* Urinary Antigen Card
ImmuView *S. pneumoniae* and *L. pneumophila* Urinary Antigen Test
Operon Simple/Stick Legio pneumo)
Standard F *Legionella* Ag FIA
Sofia *Legionella* FIA
RIDASCREEN *Legionella* ELISA
Binax™ *Legionella* Urinary Antigen EIA
Biosynex
CerTest Biotec
Legionella Monlab Test
Legionella vitassay with *pneumococcus*
Urisign *Legionella* color
Immunocatch™ *Legionella*
Nadal® *Legionella* test
Legionella K-SeT
TRU *Legionella*

En particulier, les objectifs étaient d'évaluer :

- la sensibilité des tests pour *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* non-sg1 ;
- la spécificité des tests et le taux faux positifs ;
- l'apport du chauffage des urines pour l'élimination des résultats faussement positifs ;
- l'apport des lecteurs sur la performance des tests ;
- la concordance inter-laboratoire ;
- l'apport de la méthode basée sur les LPS extraits pour comparer la sensibilité des différents kits ;
- d'établir une recommandation ESGLI pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella*.

9 *Legionella* National Reference Centres



→ To establish a ESGLI recommendation for *Legionella* urinary antigen testing



Figure 9. Schéma de l'étude de l'évaluation de 16 tests urinaires par le groupe ESGLI.

Un panel de sensibilité a été constitué : chaque laboratoire participant (n=7) a soumis 3 à 8 échantillons de 5 mL d'urine au centre Néerlandais Statum Serum Institute (n=46). Les échantillons devaient être positifs avec le test utilisé dans le laboratoire participant et l'infection par *L. pneumophila* séro groupe 1 devait être vérifiée de préférence par culture (n=39) ou au moins par un test PCR (*wzm*) positif pour le séro groupe 1 (n=7). Chaque échantillon a été divisé en deux, une partie a été traitée par la chaleur (5 minutes à 100°C dans un bain sec suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 10 000 x g). Les échantillons ont été testés sans et après chauffage et lus soit visuellement, soit par un lecteur automatique ou les deux, le cas échéant. Les résultats ont également été lus après 60 minutes d'incubation à la fois sans ou avec traitement thermique. Chaque échantillon a été lu visuellement par deux personnes ou par une seule si un lecteur était fourni. Un échantillon était considéré comme positif s'il était visuellement positif après traitement thermique par les deux lecteurs et/ou trouvé positif par le lecteur automatique. Si des résultats discordants étaient obtenus visuellement (dans le cas de bandes très faibles), l'échantillon était considéré comme invalide ou non concluant. Les résultats limites obtenus par un lecteur étaient également considérés comme non valides ou non concluants.

La sensibilité de chaque test a été évaluée en fonction du nombre d'échantillons jugés positifs parmi les échantillons examinés (n=46), et la proportion d'échantillons invalides/inconclusifs parmi les échantillons examinés est indiquée ci-dessous :

Urinary Antigen Tests	Number of positive samples	Sensitivity	Number and proportion of invalid/inconclusive samples
BinaxNOW® Legionella Urinary Antigen Card (Abbott ARD)	45/46	97.8%	0 (0 %)
ImmuView S. pneumoniae and L. pneumophila Urinary Antigen Test (SSI Diagnostica)			0 (0 %)
Urisign legionella color (servibio)			1 (1.8 %)
Legionella vitassay, single (Vitassay)			1 (1.8 %)
Legionella Monlab Test (Monlab)			1 (1.8 %)
Binax™ Legionella Urinary Antigen EIA (Abbott ARD)			0 (0 %)
Standard F Legionella Ag FIA (SD Biosensor, Orgentec)	44/46	95.7%	0 (0 %)
CerTest Legionella (Biotec)			2 (4.3 %)
Operon, Simple/Stick Legio pneumo (Operon)			0 (0 %)
Sofia Legionella FIA (Quidel / Eurobio Scientific)	41/46	89.1%	1 (1.8 %)
RIDASCREEN Legionella ELISA (R-biopharm)			2 (4.3 %)
Test Biosynex L. PNEUMOPHILA (Biosynex)	37/46	80.4%	3 (6.5 %)
Legionella K-SeT (Coris BioConcept)	35/46	76.1%	5 (10.9 %)
Immunocatch™ Legionella (EIKEN CHEMICAL CO., LTD)			5 (10.9 %)
Nadal® Legionella test 552022 (nal von minden)	34/46	73.9%	6 (13.0 %)
TRU Legionella (Meridian Bioscience)	23/46	51.1%	6 (13.0 %)

Tableau 6 : Liste des UATS testés dans l'étude européenne ESGLI

Cette étude montre une grande disparité des performances des tests en termes de sensibilité pour la détection des antigènes urinaires. L'utilisation d'un lecteur a permis d'améliorer la sensibilité par rapport à la lecture visuelle, trois

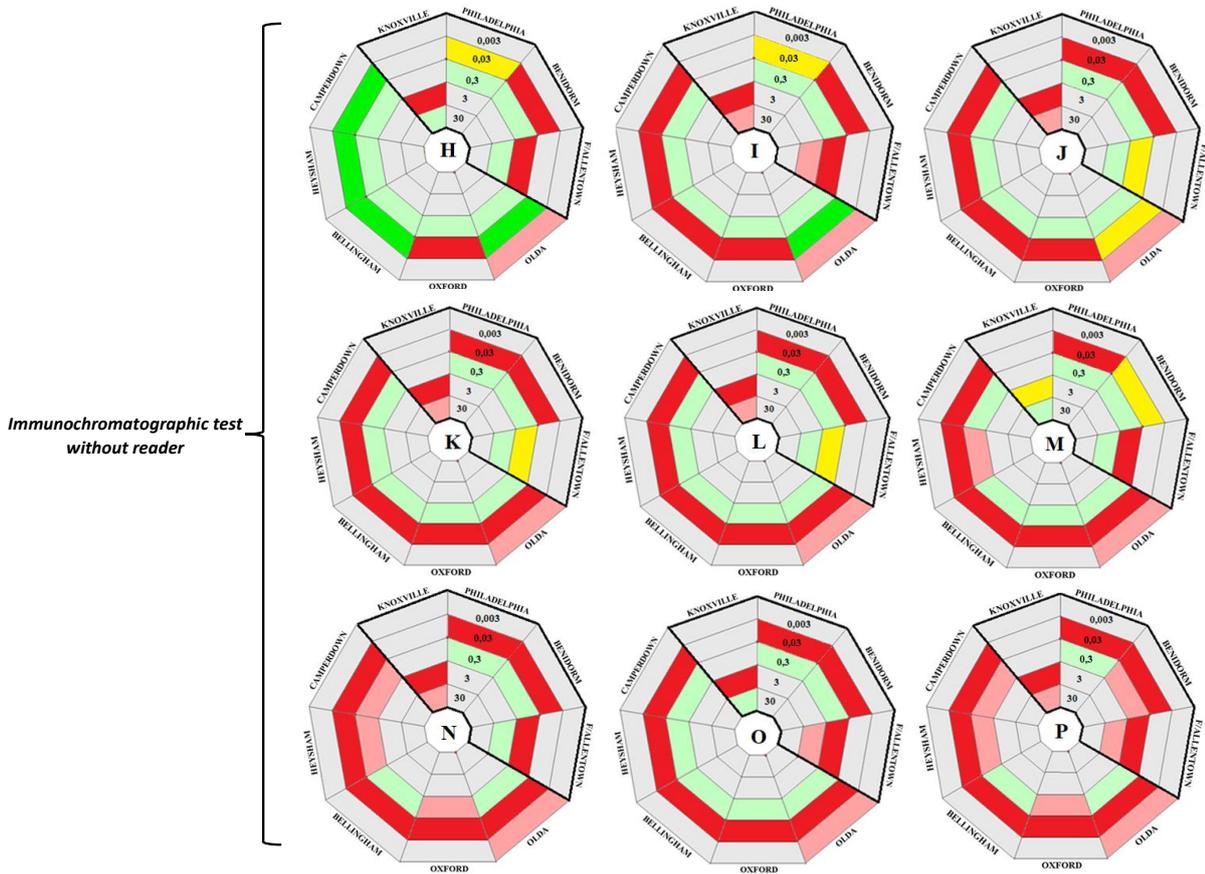


Figure 10 : Résultats de la comparaison des 16 UATS pour différentes concentrations de LPS pour 9 sous-groupes de Lp1

*** PCR sur prélèvements pulmonaires**

Evaluation du kit R-DiaLeg et de l'appareil geneLEAD VIII pour PCR Legionella sur prélèvements respiratoires (société Diagenode)

Le kit de PCR en temps réel R-DiaLeg est dédié à la détection qualitative de *Legionella* (Lsp) et *Legionella pneumophila* (Lpn) dans des prélèvements respiratoires et réalisée sur l'appareil geneLEAD VIII sur lequel est également réalisée l'extraction. Ce kit a été évalué en comparaison au kit PCR Legio pneumo/Cc r-gene® de BioMérieux.

Cette évaluation a été réalisée sur 167 échantillons (95 LBA, 51 expectorations, 20 aspirations trachéales et 1 liquide pleural) extraits sur le geneLEAD VIII en accord avec les recommandations du protocole R-DiaLeg. Sur les 143 échantillons pour lesquels un résultat a été obtenu avec les deux méthodes, le pourcentage de concordance positive est de 98,2% et le pourcentage de concordance négative de 92%.

Pour l'un des échantillons trouvés positifs avec le test R-DiaLeg et négatif avec l'autre test, la positivité a été confirmée avec un 3^{ème} test du CNR ; les 6 autres échantillons étaient négatifs avec ce 3^{ème} test. Le Ct des 6 tests positifs non confirmés par une autre méthode avaient tous un Ct > à 37. Les légionelloses à *Legionella non pneumophila* n'ont pas été intégrées dans ce tableau de concordance.

		Legio pneumo/Cc r-gene		Total
		+	-	
R-DiaLeg	+	55	7	62
	-	1	80	81
Total		56	87	143

3.2.1.3 Mise au point d'outils diagnostiques

PCR du groupe européen ESGLI détectant *L. pneumophila* et Lp1

En 2017, le CNR a mis en place une PCR en temps réel multiplexe, développée par le groupe Européen ESGLI (Mentasti *et al* ; Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015). Cette PCR cible une région spécifique de l'espèce *Legionella pneumophila* d'une part et une région spécifique du sérotype 1 de cette même espèce permettant son identification simultanément à la détection de l'espèce. Cette PCR multiplexe cible également un contrôle interne.

Elle a été comparée à la PCR Diagenode, utilisée comme PCR diagnostic au CNR-L, sur près de 300 échantillons et à la PCR maison Lp1 sur 44 échantillons positifs. Sa limite de détection a été évaluée par une gamme d'ADN réalisée à partir d'ADN étalon. Les résultats montrent une sensibilité de la PCR Lp ESGLI supérieure aux autres PCR et une limite de détection à 2,5 UG. Initialement utilisée dans la cadre d'une étude ou pour investiguer les cas d'interprétation difficile, la PCR ESGLI grâce à ses bonnes performances a remplacé la PCR maison Lp1 pour les prélèvements négatifs en culture.

PCR détectant les *L. pneumophila* ST1

En 2019, le CNR a développé en collaboration avec d'autres équipes internationales (UK, Israël) une PCR en temps réel spécifique des *L. pneumophila* ST1 (clone avec une prévalence élevée dans les infections nosocomiales) (doi: 10.1016/j.cmi.2019.09.002)

Specific real-time PCR for detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1. Ginevra C, Chastang C, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, and Moran-Gilad

PCR couplée au NGS

En 2020, le CNR a développé des approches par PCR-NGS permettant la détection des co-infections multi-espèce et/ou multi ST directement à partir des prélèvements cliniques des patients (voir paragraphe 3.2.5)

Utilisation de la métagénomique dans le diagnostic de légionellose

La métagénomique ciblée 16-S a été utilisée dans différents contextes d'infections atypiques telles que les fasciites nécrosantes à *Legionella*, des arthrites, des coinfections *Legionella* – SARS-Cov-2, et sur différents types d'échantillons (biopsie, pulmonaire, liquide articulaire, sang ...) pour valider son intérêt diagnostique mais également pour éliminer les possibles co-infections avec d'autres pathogènes d'intérêt.

3.2.2 Expertise dans l'identification et la caractérisation des agents infectieux

3.2.2.1 Caractérisation des souches de *Legionella*

*Souches cliniques

En 2021, nous avons expertisé les souches de 564 patients, dont 230 en provenance de laboratoires extérieurs et plus de la moitié, 334 isolées au CNR. L'évolution de l'expertise des souches cliniques depuis 2017 est présentée en figure 11 et tableau 7.

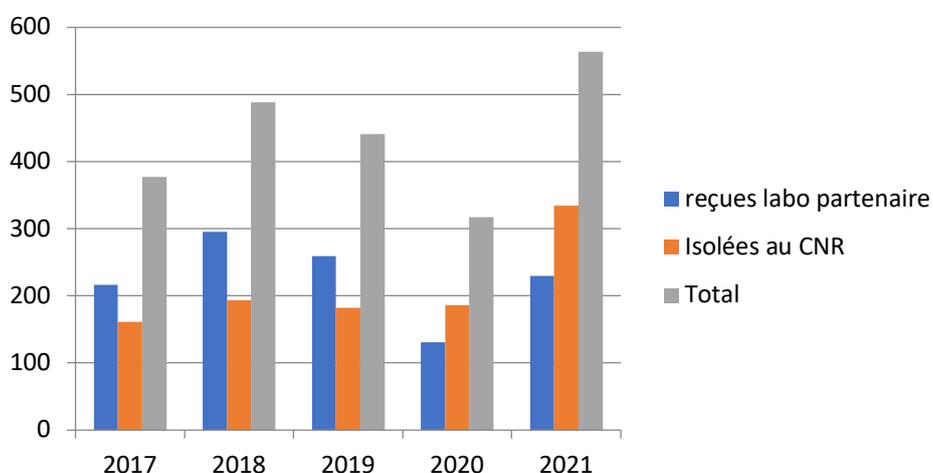


Figure 11. Evolution du nombre de souches cliniques reçues et isolées au CNR entre 2017 et 2021.

Tableau 7 Répartition en termes d'espèces de *Legionella* et de sérogroupes de *L. pneumophila* des souches d'origine cliniques isolées en France, 2017-2021.

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre d'isolements							
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
<i>Legionella pneumophila</i>	333	342	296	373	478	433	313	549
séro groupe 1	313	328	281	361	456	398	293	492
séro groupe non 1	20	14	15	12	22	35	20	57
séro groupe 2	3			1		6	4	10
séro groupe 3	6	3	1	5	6	6	3	12
séro groupe 4			1					
séro groupe 5	1	1				2		
séro groupe 6	2	4	6	2	5	4	2	2
séro groupe 7	2	3	1	1		4	2	5
séro groupe 8	2		1	1	2	5	5	2
séro groupe 9							1	2
séro groupe 10	3	1	3		2	2		1
séro groupe 12				1	1			
séro groupe 13			1				1	1
séro groupe 14					1	1		
séro groupe indéterminé*	1	2	1	1	5	5	2	21
<i>Legionella non pneumophila</i>	7	4	4	5	11	8	5	10
<i>Legionella dumoffii</i>				1	1			
<i>Legionella micdadei</i>	1		2		1			1
<i>Legionella longbeachae</i>	5	2			8	5	4	9
<i>Legionella anisa</i>		1		1				
<i>Legionella tucsonensis</i>								
<i>Legionella gormanii</i>				1				
<i>Legionella bozemanii</i>	1	1	1	1		2		
<i>Legionella feelei</i>				1				
<i>Legionella cincinatiensis</i>								
<i>Legionella wadsworthii</i>								
<i>Legionella sainthelensis</i>					1			
<i>Legionella maceachernii</i>			1				1	
<i>Legionella jordanis</i>						1		
Total	340	346	300	378	489	441	318	564

* réactions croisées en immunofluorescence directe

En Europe, en 2020, 38% des isolats d'origine clinique disponibles sont isolés en France (318 / 828 isolats disponibles) (Tableau 5 et données ECDC Surveillance Report, Legionnaires' disease in Europe, 2020) ; en 2019 elles représentaient 40% des souches isolées en Europe. Les isolats cliniques sont très majoritairement des *L. pneumophila* séro groupe 1 (entre 87% et 95%, des isolats contre 99% pour le précédent mandat). L'espèce *Legionella non pneumophila* la plus fréquemment isolée est *L. longbeachae*. Depuis 2018, nous observons une augmentation de ces souches (entre 5 et 10 par an).

*Souches environnementales

Justification de l'envoi au CNR. Le CNR préconise que ne lui soit envoyé que (1) les souches environnementales pour lesquelles l'identification est délicate, la mise sur le marché de plusieurs réactifs permettant l'identification simple de *L. pneumophila* et du séro groupe 1 de cette espèce par agglutination de particules de latex sensibilisées facilite cette préconisation ; (2) ou les souches environnementales dont Lp1 nécessitant un typage.

En chiffres : De 2017 à 2021, 2198 souches environnementales ont été envoyées au CNR (tableau 5). L'envoi est stable entre 450 et 500 souches par an, en dehors de l'année 2020 où nous avons observé une légère diminution (320 souches) expliquée par les périodes de confinement.

Les souches environnementales sont adressées au CNR-L pour identification précise (séro groupe ou espèce) ou typage lors de l'investigation de cas. Parmi les 2198 souches envoyées, 1917 (90%) étaient des *Legionella pneumophila* ; la répartition des sérogroupes est présentée en Figure 12(A).

Depuis 2019, le CNR allemand de Dresden ne met plus à disposition les anticorps monoclonaux de l'ensemble des sérogroupes de *L. pneumophila* ; nous utilisons dorénavant des latex monovalents commercialisés (Prolab) expliquant la hausse des sérogroupes non identifiés (0 en 2017, 14 en 2018 versus 111 en 2021). L'identification des 202 souches d'origine environnementale (10%) de *Legionella non pneumophila* a été réalisée par séquençage du gène *mip* de 2017 à 2019, par technique de MALDI-TOF depuis 2018 ou par analyse du génome complet séquencé par NGS depuis 2019

La répartition des espèces identifiées est présentée en Figure 12(B). Les souches rendues *Legionella spp* sont des souches non identifiées car reçues dans le cadre d'une demande de comparaison avec une souche clinique de *L. pneumophila* ou plus rarement non identifiable par les techniques actuelles (cf. 3.2.2.2).

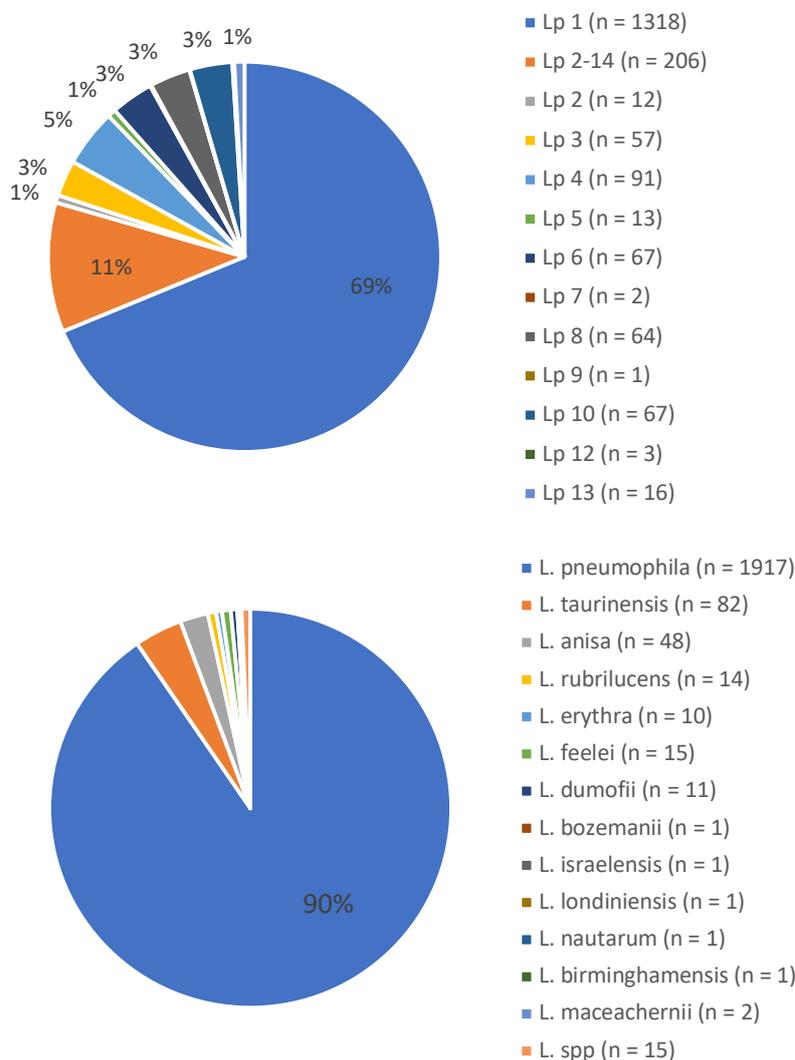


Figure 12. Distribution des souches d'origine environnementale adressées au CNR-L de 2017 à 2021, (A) en termes de séro groupe des souches de *L. pneumophila* ; (B) en termes d'espèce des souches de *Legionella non pneumophila*.

3.2.2.2 Expertise et aide à l'identification - Rôle d'observatoire des souches atypiques

*Identification des *L. pneumophila*

Nous disposons d'outils uniques pour identifier le sérotype de *L. pneumophila*. La spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS) ne permet pas la différenciation des sérotypes de *L. pneumophila*. L'identification par des techniques immunologiques est délicate. Très peu de réactifs commercialement disponibles permettent l'identification de chaque sérotype de *L. pneumophila* et leur utilisation est peu compatible avec les laboratoires nécessitant l'analyse de nombreuses souches. Aucun réactif ne permet l'identification du 16^{ème} sérotype de *L. pneumophila* (Jena-1) décrit en 1995 par Lück *et al.* Ainsi nos techniques sont une solution de recours pour les laboratoires partenaires qui ne peuvent pas identifier très précisément leurs souches.

Le CNR utilise d'abord des réactifs latex polyvalents permettant la différenciation du sérotype 1 des autres sérotypes. Les anticorps monoclonaux de Dresden mis à disposition par le CNR des Légionelles de Dresden en Allemagne correspondent à la méthode immunologique de référence pour caractériser les sérotypes. Ils étaient utilisés au CNR jusqu'en 2018/2019 en fonction des sérotypes (jusqu'à épuisement des stocks) mais n'ont plus été fournis depuis. En alternative, le CNR dispose également d'une technique d'immunofluorescence indirecte « maison » par fixation de la souche à analyser sur lame puis contact avec des anti-sérums de lapins immunisés vis-à-vis d'un sérotype de *L. pneumophila* ou d'une espèce de *Legionella non pneumophila* et révélation par des immuno-globulines anti-lapin. Cependant cette technique présente de nombreuses réactions croisées entre les sérotypes, raison pour laquelle elle est couplée à une trousse commercialisée *Legionella Agglutination Latex Reagents* (PROLEX, PROLAB). Ce test permet d'identifier 13 sérotypes (2 à 14) de *Legionella pneumophila* sérotype non 1 grâce à des latex spécifiques monovalents sensibilisés vis-à-vis de chacun d'entre eux. Malgré cette combinaison de tests, les souches pour lesquelles le sérotype reste indéterminé (présence de réactions croisées) est plus important qu'avec les anticorps monoclonaux de Dresden.

A l'avenir, le CNR a demandé une nouvelle mise à disposition d'anticorps monoclonaux au CNR Allemand de Dresden.

*Identification des *Legionella non pneumophila*

La technique MALDI-TOF-MS permet d'identifier de nombreuses souches de *Legionella non pneumophila*. Les bases de données de spectrométrie commerciales (BioMérieux Vitek-MS et Bruker) ont été implémentées pour de nombreuses espèces ces dernières années (cf 3.2.2.3). Les méthodes d'identification moléculaire développées pour l'identification des différentes espèces de légionelles sont basées sur la comparaison de séquences de portions de gènes ou de séquences inter-géniques (gènes *mip*, *gyrA*, *rpoB*, *rnpB*, espace intergénique 23S-5S, ARNr 16S et 5S) ; les cibles ARNr 16S et *mip* sont les plus utilisées actuellement, le « gold standard » actuel étant le séquençage du gène *mip*. L'accès au génome complet des souches par NGS a permis depuis 2019 la mise en place de nouvelle technique d'identification des espèces basée sur l'analyse du génome (cf. 3.2.5).

* Participation à l'identification de nouvelles espèces

Entre 2016 et 2021, 5 souches environnementales n'ont pas pu être identifiées par MALDI-TOF et par séquençage du gène *mip*. L'analyse par orthoANI après WGS suggère que ces 5 souches appartiennent à 5 nouvelles espèces de *Legionella*. Ces souches sont en cours de caractérisation.

3.2.2.3 Evaluation de méthodes d'identification

Evaluation de la version 3.2. de la base de données Myla (BioMérieux) pour l'identification des *Legionella* par Maldi-Tof (base de données Maldi-Tof de BioMérieux).

Jusqu'en 2019, le CNR utilisait la base de données SARAMIS pour identifier les souches environnementales de *L. non pneumophila*. Cette base de données ouverte permettait d'identifier un plus grand nombre d'espèces que la base de données Myla mais présentait l'inconvénient d'être plus sensible à la qualité du dépôt et donc d'avoir des performances technicien-dépendantes. La version 3.2 de la base de données Myla inclut de nouvelles espèces de *Legionella* (18 au total). Nous avons donc comparé les performances de cette base de données par rapport à la base de données SARAMIS. Au total, 43 souches ont été testées dont 39 appartenant aux espèces de la base de données Myla et 4 appartenant à des espèces non connues de la base Myla. 75% des souches ont été correctement identifiées (score d'identification = 99.9) par la base Myla alors que seules 71% des souches étaient identifiées par la base de données SARAMIS (score d'identification $\geq 85\%$). Les 4 souches appartenant à des espèces non incluses dans la base de données Myla n'ont pas pu être identifiées par la base de données Myla et 2 d'entre elles ont été identifiées par la base de données SARAMIS avec un score acceptable ($\geq 85\%$). En base de données SARAMIS, aucune espèce n'a donné de fausse identification. Par

contre, en base de données Myla, une souche de *Legionella gormanii* a été rendue *L. pneumophila* avec un score acceptable (99.9%).

La base de données Myla est plus facile d'utilisation et présente de meilleures performances que la base de données SARAMIS sur les espèces les plus courantes. Les souches dont les espèces sont absentes de la base de données Myla représentent en 2019 : 2 souches environnementales envoyées au CNR et 0 souches cliniques. Cependant notre étude a montré un cas de mauvaise identification par la base de données Myla qui a rendu *L. pneumophila* au lieu de *L. gormanii*. Il est donc essentiel de confronter les résultats rendus par la base de données Myla aux autres tests réalisés (latex par exemple).

Identification des *L. non pneumophila* d'origine clinique ou environnementale par analyse des données de séquençage (voir chapitre 3.2.5)

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

3.2.3.1 Evolution et développement des activités

Legionella est caractérisée par une sensibilité aux antibiotiques couramment utilisés dans le traitement des légionelloses : macrolides, fluoroquinolones et rifampicine.

Néanmoins, des rechutes ou récurrences de légionellose chez des patients correctement traités, faits qui restaient très peu décrits jusqu'alors, ont été rapportées au CNR (Pouderoux *et al.*, CID, 2020). Par ailleurs, la description d'infections avec des souches résistantes aux fluoroquinolones en 2014-2015 (Bruin *et al.*, JAC, 2014 ; Shadoud *et al.*, EBioMedicine, 2015) nous a incité à disposer de techniques permettant une surveillance active de la résistance aux antibiotiques chez *Legionella*.

Sur la période 2017-2021, alors que le nombre de demandes d'antibiogrammes par les cliniciens est resté stable (moins de 10 demandes par an), le CNR a mis progressivement en place de façon plus systématique la réalisation d'antibiogrammes par microdilution : environ 450 antibiogrammes réalisés en 2019-2021.

Un pipeline permettant la détection d'une pompe à efflux pour les macrolides et la détection des mutations associées à une résistance aux fluoroquinolones, aux macrolides et à la rifampicine pour l'ensemble des souches d'origine clinique et environnementale typées par WGS a également été développé et a permis **la détection et la caractérisation de la 1^{ère} souche résistante aux macrolides** (cf 3.4.3). Le CNR dispose ainsi à la fois de techniques phénotypiques et moléculaires permettant une veille active sur l'apparition de phénomènes émergents.

En cas de souche non isolée, le CNR dispose d'une technique de PCR / séquençage par Sanger et/ou NGS ciblant les gènes impliqués dans la résistance aux trois familles thérapeutiques (gènes *gyrA*, *rrl*, *rplD*, *rplV* et *rpoB* respectivement) réalisable directement sur prélèvement.

Pour compléter ces capacités d'expertise, le CNR a réalisé des expérimentations d'évolution expérimentale en présence des trois familles d'antibiotiques utilisées dans le traitement des légionelloses et dispose désormais d'une collection de souches avirulentes résistantes aux macrolides (n=7), aux fluoroquinolones (n=9) et à la rifampicine (n=7) parfaitement caractérisées sur le plan génomique.

Le CNR a enfin contribué à l'élaboration des nouvelles recommandations de l'EUCAST pour la réalisation des antibiogrammes (Guidance document on *Legionella* susceptibility testing – version 2, EUCAST, May 2021), témoignant d'une expertise sur cette thématique de la résistance reconnue au niveau européen.

3.2.3.2 Evaluations de techniques

*** Evaluation de plaques 96 puits MICRONAUT-S (Biocentric) fabriquées à façon pour la réalisation d'antibiogrammes de *L. pneumophila***

Il n'existe pas de kit commercialisé permettant facilement la détermination des CMI des antibiotiques par microdilution pour *Legionella*. Cette technique étant très chronophage, en 2020, le CNR a sollicité Biocentric pour la réalisation de plaques 96 puits permettant de répondre à cette demande (plaque conçue en collaboration avec le CNR des IST bactériennes, Bordeaux, présentant des gammes d'antibiotiques adaptées aux *Mycoplasma* et *Legionella*).

Les CMI de l'azithromycine (AZI), l'érythromycine (ERY), la lévofloxacine (LVX), la doxycycline (DOX) et la rifampicine (RIF) obtenues par microdilution en plaque 96 puits par les techniques « maison » versus « MICRONAUT-S » ont été comparées pour 171 souches cliniques de *L. pneumophila* séro groupe 1 (Lp1) et 23 mutants Lp1 sélectionnés *in vitro*. Les résultats pour les 171 souches cliniques sont les suivants :

Tableau 8 : Distribution des CMI des 5 antibiotiques testés par microdilution avec les techniques « maison » et MICRONAUT-S, représentée en nombre de souches présentant une CMI donnée :

		CMI (mg/L)												
		≤0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
AZI	Maison				19	43	64	21	8	9	6	1		
	MICRONAUT-S					4	85	55	2	25				
ERY	Maison				1	19	41	61	33	11	5			
	MICRONAUT-S						15	113	37	6				
LVX	Maison		1	17	125	28								
	MICRONAUT-S				44	127								
DOX	Maison						1	1	8	66	84	9	2	
	MICRONAUT-S							1		7	90	73		
RIF	Maison	171												
	MICRONAUT-S	169	2*											

AZI, azithromycine ; ERY, érythromycine ; LVX, lévofloxacine ; DOX, doxycycline ; RIF, rifampicine.

* CMI ≤ 0,002 mg/L après vérification.

La concordance de CMI entre les 2 techniques était de 76,0% pour AZI, 83,6% pour ERY, 96,5% pour LVX, 77,8% pour DOX et 98,8% pour RIF. Comme pour la technique « maison », la technique MICRONAUT-S permettait de détecter les souches RIF-R (CMI (RIF) ≥ 4 mg/L), macrolide-R (CMI (ERY) ≥ 1 mg/L) et fluoroquinolone-R (CMI (LVX) ≥ 0,125 mg/L). Les CMI des souches résistantes aux macrolides étaient rarement concordantes.

Ces travaux ont fait l'objet du stage de fin d'études d'IUT de Mmes Lise URAST et Clérence PACCAUD. Deux e-posters ont été présentés à la RICAI (décembre 2020) et à l'ECCMID 2021.

* Evaluation de plaques 96 puits Sensititre fabriquées à façon pour la réalisation d'antibiogrammes de *L. pneumophila*

En 2021, le CNR a sollicité la société Sensititre pour la réalisation d'une étude similaire afin d'évaluer une solution alternative à la technique « maison » actuellement utilisée au CNR. L'étude est actuellement en cours.

3.2.4 Expertise dans la détection des légionelles de l'environnement

3.2.4.1 Développement et mise à disposition de Matériel de Référence certifié

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

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

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

Ce matériel de référence certifié a été soumis à des études de stabilité et des échantillons sont régulièrement testés pour s'assurer de leur qualité. Un système de surveillance informatisé est en place pour s'assurer des bonnes conditions de stockage. Le site Internet mis en place, accessible depuis la page d'accueil du site du CNR (<https://cnr-legionelles.univ-lyon1.fr/>), disponible en français et en anglais, est régulièrement mis à jour et permet aux laboratoires demandeurs de s'informer sur les produits disponibles.

En 2017, nous avons montré la possibilité d'utiliser la **droplet digital PCR (ddPCR)** (BioRad), méthode de PCR quantitative pour obtenir **une quantification absolue et un suivi de la stabilité du matériel de référence**. Cette méthode pourrait être utilisée pour certifier (attribuer une valeur à) un nouveau lot d'ADN avec une incertitude réduite, un protocole simple et un faible nombre d'échantillons à tester. Cette méthode est une méthode adaptée pour contrôler régulièrement la stabilité du CRM.

Quantification of Legionella DNA Certified Reference Material (CRM) by digital droplet PCR (ddPCR). Baume M, Cariou A, Leveau A, Fessy N, Pastori F, Jarraud S, Pierre S. *J Microbiol Methods*. 2019 Feb;157:50-53.

La stabilité de ce Matériel de Référence Certifié est depuis vérifiée par PCR quantitative (système GenSystems) et par ddPCR (système BioRad), les résultats étant concordant.

Depuis 2017, 89 matériels de référence certifiés et 18 CQE ont été distribués directement à 8 laboratoires français et 14 laboratoires étrangers (Allemagne, Belgique, Canada, Danemark, Espagne, Irlande, Pays Bas, Italie, Japon, Suisse, et Royaume Uni). Ces envois sont constants chaque année, exception faite de l'année 2020. De plus, 62 ADN étalon et 9 CQE ont été distribués par le distributeur spécialisé LGC Standard, avec lequel nous avons une convention, uniquement dans des laboratoires à l'étranger (Figure 13). Nous ne connaissons pas les laboratoires fournis par LGC Standard.

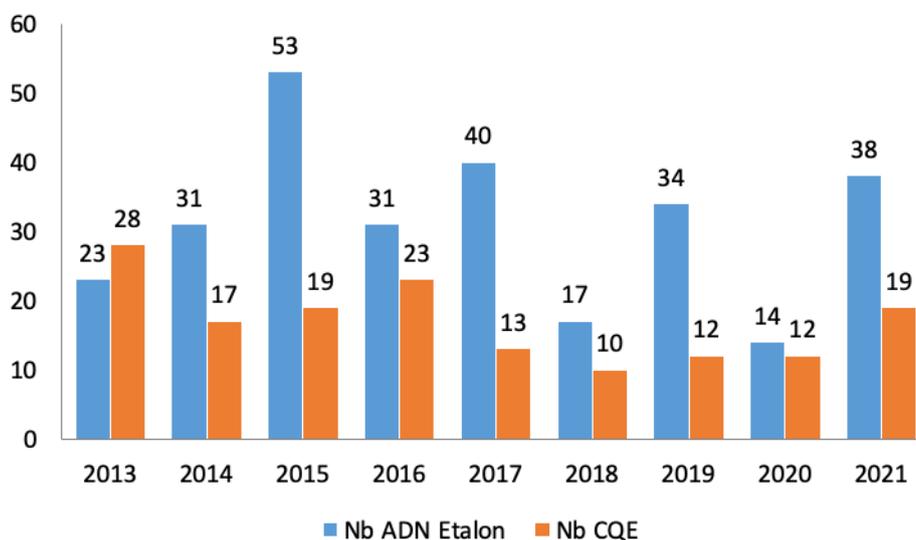


Figure 13 Distribution de l'ADN étalon et du contrôle quantitatif de 2013 à 2021.

3.2.4.2 Evaluation de méthodes ou réactifs

2018 - Evaluation de l'ajout du réactif Free DNA Removal Solution (FDRS) dans le kit iQ-Check™ Reference (Biorad) pour la quantification de l'ADN de *Legionella* dans les eaux.

Contexte : Un inconvénient majeur de la méthode PCR pour la quantification de *Legionella* dans les eaux est la détection d'ADN libre, non associé aux bactéries viables. Fin 2018 et en 2019, le réactif FDRS ajouté à la suite à l'étape d'extraction

de prélèvements d'eaux et qui a pour but de limiter la quantité d'ADNg libre détecté par PCR par une réaction enzymatique a été évalué au CNR en comparaison à la PCR Biorad sans ajout de ce réactif et à la culture sur des échantillons d'eaux chaudes sanitaires. Cette étude a fait l'objet d'un poster à ESGLI 2019, Athènes.

Ltifi F, Beraud L, Allam C, Descours G, Ginevra C, Jarraud S. Evaluation of the supplement Free DNA Removal Solution (FDRS) step in the Bio-Rad iQ-Check *Legionella* PCR method on sanitary hot water samples. 6th ESGLI meeting, 10th-12th September 2019, Athens, Greece

Matériels et Méthodes: 101 eaux chaudes sanitaires de 7 hôpitaux différents ont été testés avec 3 méthodes: iQ-Check Quanti L. pneumophila et L. spp. Real-Time PCR avec et sans la méthode additionnelle FDRS Method, et par culture. Pour chaque méthode, 100 mL d'échantillons d'eau ont été filtrés. La méthode FDRS inclus une incubation de 30 min supplémentaire à 37°C.

Résultats : La présence et l'élimination de l'ADN avec le FDRS peut-être suggérée pour les cas #1 à #4. Pour la majorité des échantillons, la détection d'ADN est restée positive après l'utilisation du FDRS. Cependant, nous notons une réduction de 0,3 à 1,51 log du signal pour 34% et 27% pour la quantification de *Legionella spp* et *L. pneumophila* respectivement. Pour *L. pneumophila*, 11.9% des échantillons sont devenus négatifs avec le FDRS et ont donné le même résultat que la culture. Aucune inhibition de PCR n'a été observée et de façon intéressante, l'ajout de FDRS a permis la levée de l'inhibition de 13 échantillons (12.8%)

	iQ-Check (w/o FDRS)	qPCR iQ-Check Test (w/ FDRS)	Culture	Number of samples found (x/101)	
				L. spp	Lp
Case #1	+	-	-	2	12
Case #2	+	+ ¹	+	23	14
Case #3	+	+ ²	-	75	19
Case #4 ³	+	-	+	0	6
Case #5 ⁴	-	-	+	0	3
Case #6	-	+	-	0	6
Case #7	-	-	-	1	41
Total	N/A	N/A	N/A	101	101

^{1,2} *Legionella* et/ou AND de Lp DNA toujours positif mais a diminué de >0.3 log en comparaison à l' iQ-Check® qPCR sans FDRS (n=31) (¹n=7, ²n=24); ³ Six culture positive pour Lp4 (n=3), Lp5 (n=2) and Lp1 (n=1); ⁴ Trois culture positive pour Lp5

Conclusion : Nos résultats suggèrent que le traitement rapide par la solution iQ-Check FDRS peut éliminer l'ADN libre dans des prélèvements d'eau. Le FDRS doit être évalué sur d'autres types d'échantillons, notamment des eaux complexes.

2017-2018 - Evaluation du test Legiolert™ commercialisé par la société IDEXX pour la recherche de *Legionella pneumophila* dans les eaux.

Le test Legiolert™, proposant une méthode de quantification de *L. pneumophila* dans les eaux par une recherche simple (sans test complémentaire) basée sur le nombre le plus probable (NPP), donnant une réponse à 7 jours, a été évalué en 2017 et 2018 au CNR des Légionelles et a fait l'objet de présentations sous forme de posters aux congrès ESGLI 2018 et RICAI 2018.

Objectif. Evaluer les performances de la méthode IDEXX Legiolert™, technique simple permettant la détection et la quantification de *Legionella pneumophila* (Lp) dans des échantillons d'eau potable en 7 jours basée sur le principe du nombre le plus probable (NPP).

Matériels et méthodes. Un total de 125 échantillons d'eau potable des Hospices Civils de Lyon ont été analysés avec la méthode Legiolert™ et avec la méthode de référence selon la Norme Française (NF) T90-431:2017. Ces échantillons ont été prélevés au niveau de robinets, douches, vannes ou fauteuils dentaires. Afin de vérifier la spécificité, 10% des puits positifs de la méthode Legiolert™ étaient ouverts et remis en culture sur géloses spécifiques.

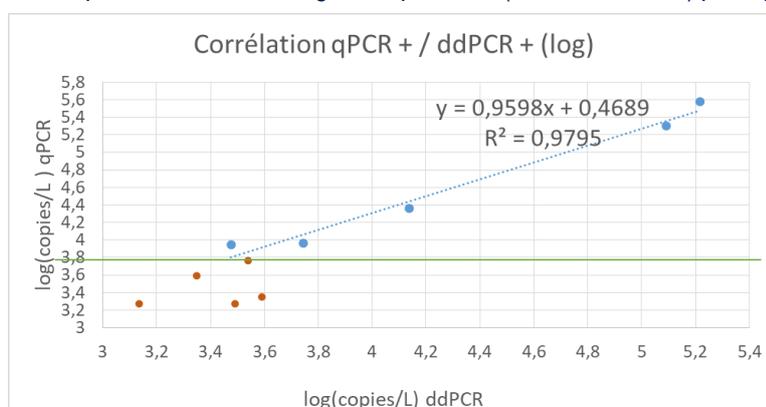
Résultats. 72 échantillons étaient négatifs par les 2 méthodes, 10 positifs à *L. anisa* (seulement avec la NF), 43 étaient positifs à Lp (35 avec les deux méthodes, 5 avec la NF seulement et 3 avec la technique Legiolert™ seulement). Les puits positifs testés sur gélose ont montré une spécificité de 100% pour Lp. La concordance entre les deux méthodes était de 93,6%. La quantification de Lp obtenue avec Legiolert™ a été comparée avec celle obtenue avec la NF (incertitude de

mesure: [-0,540; 0,540]) sur les 35 échantillons positifs par les 2 techniques. Pour 26 échantillons, la différence entre les 2 techniques était comprise dans la zone d'incertitude. Pour les 8 échantillons à *Lp* autre que sérotype (sg) 1 (3 sg3, 4 sg3-6 et 1 sg4), Legiolert™ donnait des résultats inférieurs à ceux retrouvés par NF pour 6 échantillons. Cette différence était significativement différente lorsque la quantité de *Lp* était environ de 1000 UFC/L (2 échantillons) et le résultat Legiolert™ était supérieur à 1000 UFC/L alors que le résultat selon la NF était inférieur à ce seuil, seuil en France pour le déclenchement d'actions correctives.

Conclusion. La méthode Legiolert™ propose une méthode d'identification et de quantification de *Lp* dans l'eau potable, simple et rapide à réaliser, facile à interpréter et fiable (bonne spécificité et bonne concordance avec la méthode de référence). Certaines différences dans la quantification ont été observées, un nombre plus important d'échantillons devra être analysé pour permettre une conclusion sur ces données. Pour conclure, Legiolert™ pourrait aider aux contrôles sanitaires et permettre la mise en place d'actions correctives le plus précocement possible. Il est à noter cependant que la lecture ne peut pas se faire avant 7 jours ce qui n'est pas le cas de la méthode de référence par culture avec laquelle une lecture intermédiaire est possible dès 5 jours.

2021- Evaluation d'une technique de ddPCR pour la quantification de l'ADN de *L. pneumophila* dans les prélèvements d'eaux.

Objectif : Comparaison des performances de la digital droplet PCR (ddPCR, BioRAD) par rapport à la qPCR (BioRAD, iQ-



Check, Legionella Real Time PCR) pour la quantification de l'ADN de *L. pneumophila* dans les prélèvements d'eaux.

Matériels et méthodes : Nous avons testé la ddPCR et la qPCR sur 102 échantillons d'eaux en prospectif provenant des Hospices Civils de Lyon dans le cadre de la recherche de Légionelles en routine.

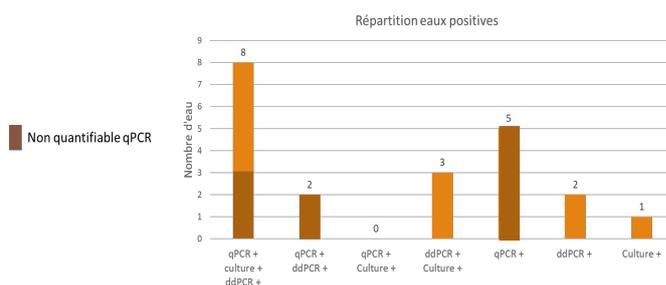
Résultats : Sur les 102 échantillons, 5 étaient quantifiables en qPCR et 15 en ddPCR. 10 ont été rendus positifs non quantifiables en qPCR et 87 étaient négatifs dans les deux techniques. Une bonne corrélation est obtenue entre les 2 techniques pour les valeurs quantifiables (cf figure 14)

Figure 14. Résultats des Corrélation entre la ddPCR et la qPCR sur 10 prélèvements positifs.

Conclusion : Nous obtenons une bonne concordance entre les deux techniques (90,2%) et une bonne corrélation. Un des avantages de la ddPCR est de pouvoir quantifier de manière absolue et donc de pouvoir quantifier avec précision de très faibles quantités d'ADN (LOD=LOQ= 1 copie/mL), sans avoir recours à une gamme étalon. En revanche, dans cette étude, la ddPCR n'était pas plus sensible que la qPCR et celle-ci nécessite des équipements particuliers.

3.2.4.3 Activités d'expertise

De nombreux laboratoires environnementaux performants et accrédités réalisent la recherche de légionelles dans l'eau par culture selon la méthode normalisée NFT90 431. Le rôle du CNR n'est pas de se substituer à eux. Nous avons donc



volontairement centré nos activités et notre expertise sur la détection des légionelles au sein d'environnements complexes non soumis à accréditation.

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

Afin de conserver une expertise pour la recherche de légionelles par culture et PCR, l'Institut des agents Infectieux réalise la détection de légionelles pour l'ensemble des hôpitaux des Hospices Civils de Lyon (HCL). Cette activité ne fait pas partie du bilan d'activité du CNR. Elle est réalisée par les techniciens du CNR mais sur une partie de leur ETP non reportée sur le CNR. Le laboratoire est accrédité pour ces deux méthodes (n° accréditation 1-2423). Cette activité comprend les eaux propres uniquement.

Le maintien de l'accréditation pour la méthode normalisée PCR NFT90 471 est important car en 2022 seuls 5 laboratoires en France demeurent accrédités pour cette méthode.

En 2021, 761 prélèvements d'eaux ont été analysés par culture et/ou PCR dont 22 uniquement par PCR. Ce chiffre est stable par rapport à 2019 (720 prélèvements) et supérieur à 2020 (n= 613), année où les analyses ont été suspendues pendant la période de confinement.

* **Expertise du CNR dans la détection de légionelles dans des environnements non soumis à l'accréditation, en particulier dans les environnements complexes lors d'investigation de cas.** On peut citer notamment :

- **Analyse des eaux des appareils à pression positive, appareils d'oxygénothérapie, humidificateurs** (22 investigations depuis 2017, voir chapitre 3.4.4.2) ;

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

Le CNR a proposé des recommandations pour la réalisation des prélèvements adressés lors de l'investigation des cas (Guide du HCSP - Risque lié aux légionelles – guide d'investigation et d'aide à la gestion, 2013). L'eau restante ou les résidus de produits (aérosolthérapie) dans le réservoir du dispositif constitue le meilleur échantillon mais est malheureusement rarement disponible. L'ensemble du dispositif amovible si possible peut être réquisitionné : le réservoir, la tubulure, le masque, les embouts nasals pour réaliser un écouvillonnage de différentes tubulures pour mise en culture ou un rinçage de l'appareil avec un faible volume d'eau stérile pour PCR et mise en culture. Les sensibilités de ces méthodes sont malheureusement faibles. Enfin, l'eau utilisée pour remplir le réservoir (eau du robinet, eau embouteillée, eau stérile...) doit être prélevée.

- **Analyse de terre et de terreaux notamment dans le cadre d'investigation de cas à *L. longbeachae*** (9 investigations depuis 2017, voir annexe 8) ;

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

De 2017 à 2021, le CNR a analysé 16 prélèvements de terres ou terreaux.

- En 2019, 3 prélèvements de terreaux ont été reçus en lien avec un cas de légionellose à *L. longbeachae*. La mise en culture, fortement contaminée, n'a pas permis d'isoler de colonies de *Legionella*. Les PCR *Legionella spp* étaient fortement positives alors que les PCR *Legionella pneumophila* étaient négatives. La PCR 23s-5s directement sur prélèvement était elle aussi positive mais le séquençage réalisé en Sanger en 2019 était interprétable avec probablement un mélange de plusieurs espèces de *Legionella*.
- En 2020 - 2021, plusieurs cas de légionellose à *L. longbeachae* ont été identifiés en Vendée, nous amenant à étudier 5 prélèvements de terreaux et/ou fumier en lien avec 4 cas. Pour les 4 patients, le diagnostic a été posé par PCR par le CNR-L. Pour 3 cas, nous avons isolé une souche clinique de *L. longbeachae* par culture. La mise en culture des différents prélèvements de terreaux a permis d'isoler une souche de *Legionella pneumophila* sérotype 3 dans un des prélèvements. Les PCR *Legionella spp.* étaient fortement positives mais le séquençage 23s-5s restait interprétable sur les échantillons de 2020. Depuis 2021, une technique de séquençage du 23s-5s par NGS nous permet d'identifier la présence de plusieurs espèces au sein d'un prélèvement, notamment pour le terreau en

lien avec le cas de 2021, la présence de *L.longbeachae* et *L.shakespearei*. Cette technique ne permet cependant pas de comparer phylogénétiquement la souche du terreau à la souche responsable de l'infection.

- En 2021, 7 autres prélèvements de terreaux ont été analysés en lien avec 4 cas de légionellose à *L. longbeachae*. Tous les prélèvements étaient positifs en PCR *Legionella* spp. 2 prélèvements ont permis d'identifier des *Legionella* en culture : 1 cas à *Legionella pneumophila* sérotype 8 ou 10 et un cas avec 2 espèces cultivées, *Legionella pneumophila* sérotype 2, 8 ou 10 et *Legionella bozemanii*. La technique de séquençage 23s-5s par NGS a été appliquée sur ces prélèvements et retrouve la présence de plusieurs espèces de *Legionella* dont *L. longbeachae* pour 3 des 4 cas.

L'indépendance des cas de légionellose à *L. longbeachae* nous oblige à explorer de nouvelles sources de contamination comme les terreaux. La culture de ces prélèvements s'avère difficile car de faible sensibilité et fortement contaminée notamment avec des moisissures de l'environnement. **Le développement du séquençage 23s-5s par NGS** nous permet d'identifier la présence de plusieurs espèces au sein d'un prélèvement et de conclure à la présence de *L. longbeachae* dans presque tous les terreaux analysés. Nous remarquons aussi la présence d'autres espèces pathogènes comme *L. pneumophila* ou *L. bozemanii*.

- **Analyse de matrices complexes dans des contextes particuliers, notamment d'enquête autour d'un ou plusieurs cas de Légionellose**

En 2017, le CNR a ainsi analysé 4 prélèvements d'eau en provenance de TAR et 2 prélèvements d'eau dans un cabinet de kinésithérapeute à Montpellier. Ces 2 derniers prélèvements étaient en lien avec une surincidence de cas dans l'Hérault ayant fait l'objet de la publication suivante : Rousseau C, et al. A Community Outbreak of Legionnaires' Disease with Two Strains of *L. pneumophila* Serogroup 1 Linked to an Aquatic Therapy Centre. Int J Environ Res Public Health. 2022 Jan 20;19(3):1119.

En 2018, 6 prélèvements atypiques (station d'épuration, laveurs d'air, installation frigorifique d'une grande surface avec condensateur en toiture) pour recherche de *Legionella* ont été réalisés autour d'Aurillac dans le contexte de surincidence observé depuis plusieurs années (chapitre 3.5.1).

En 2019, le CNR a analysé 16 prélèvements d'eau en lien avec **une surincidence de cas dans la commune de Rochefort**. Plusieurs cas de légionelloses ont été signalés ayant un lien avec la ville de Rochefort (passage aux thermes ou domicile) en juin 2019. En tout, 4 cas, dont 3 ayant fréquenté les thermes et le 4^{ème} domicilié à Rochefort ont été notifiés. Un seul prélèvement pulmonaire a été reçu au CNR, et a permis d'isoler des Lp1 ST47. Concernant l'enquête environnementale, les autocontrôles de l'établissement thermal ont été étudiés et tous étaient conformes. Plusieurs autres sites ont été ciblés notamment la lagune du conservatoire littoral et du bassin pluvial (négatifs en PCR), l'eau du brumisateur sortie aspergeur, le centre horticole municipal (PCR Lp1 positive, mais aucun Nested-Sequence-Type n'a pu être obtenu). Au total, ni le caractère groupé sur le plan microbiologique, ni la source de contamination n'ont pu être confirmés pour cet épisode.

En 2019, analyse de 4 prélèvements de l'eau de condensat du bac de relevage de la chaufferie à biomasse en lien avec l'épidémie à Strasbourg (cf. 3.5.2).

3.2.5 Application et développement des techniques innovantes (NGS, WGS, Sérologie haut débit,...)

Technologie Illumina® :

En 2019 nous avons évalué le kit de préparation de librairie DNAPrep de chez Illumina®. Les performances sont équivalentes à la génération précédente (Nextera XT). La simplification des conditions de préparation de la librairie permet un gain de temps et une limitation de risques d'erreur mais le coût du kit est plus important.

En 2019 également, une évaluation de l'automate de pipetage Mosquito HV, permettant en plus de l'automatisation des pipetages, de réduire les volumes pipeter tout en gardant la précision nécessaire a été réalisée. En 2020, nous avons fait l'acquisition d'un automate de pipetage Mosquito HV ce qui nous a permis de diminuer d'un facteur 10 les volumes réactionnels lors de la préparation des librairies. Cette réduction de volume et donc de coût nous a permis de passer à la nouvelle version du kit de préparation de librairie (DNAPrep) évalué en 2019.

Pipeline d'analyse (figure 15) :

Le pipeline d'analyse utilisé pour traiter les données de WGS comporte plusieurs parties dédiées:

- à la vérification de la qualité des données issues du séquençage mais aussi issues du pipeline lui-même,

- au génotypage : détermination du ST des souches, détermination du cgMLST des souches,
- à la recherche de gène de résistance et de virulence (*peAB*, *lag*),
- à la recherche de polymorphismes associés à la résistance aux antibiotiques.

Ce Pipeline est codé sous Nextflow appelant des images singularity.

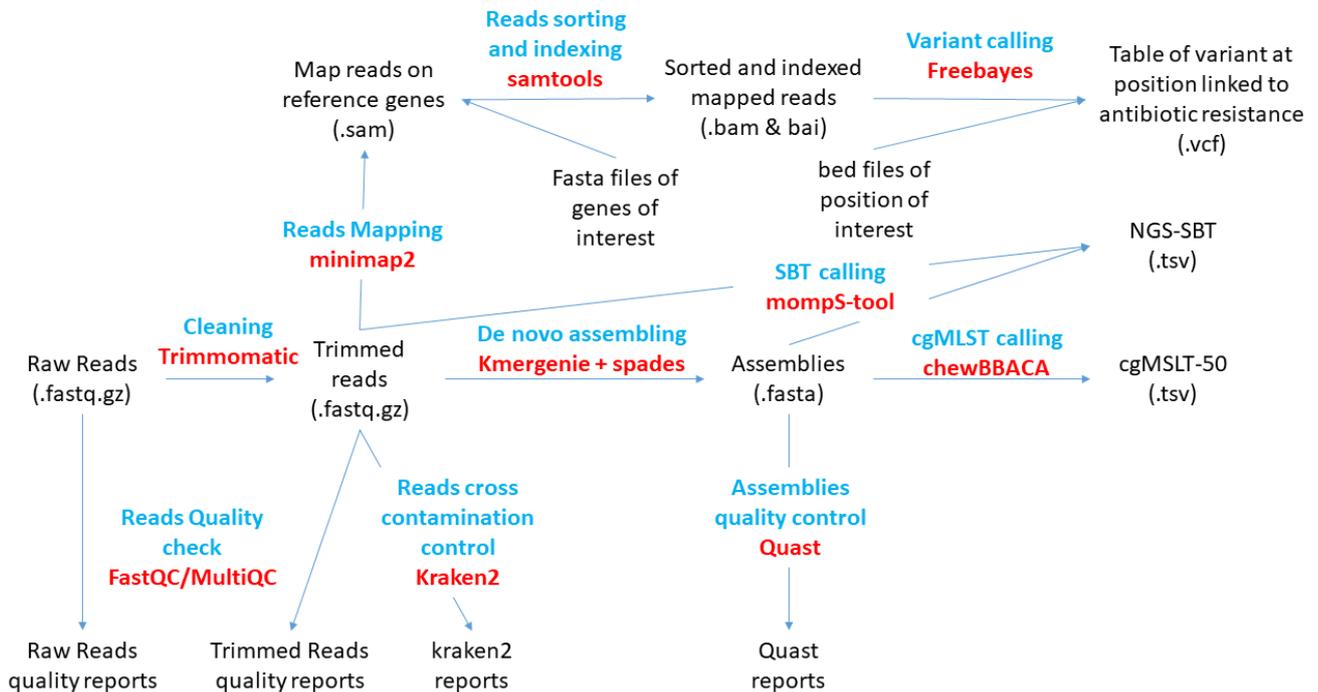


Figure 15: Pipeline d'analyse des données de WGS. Pipeline codé sous Nextflow appelant des images singularity.

Technologie Nanopore :

Dans le but de visualiser certains réarrangements structuraux du chromosome, nous avons mis en place un séquençage « long read ». Nous avons utilisé pour cela la technologie Nanopore. Plusieurs stratégies ont été évaluées :

- Séquençage Nanopore flowcell 9.4.1 seul
- Séquençage Nanopore flowcell 9.4.1 + séquençage Illumina® (Assemblages Hybrides)
- Séquençage Nanopore flowcell 10.4 (Chimie 12, Nanopore early access program)
- Le séquençage avec la nouvelle chimie 14 (toujours dans le cadre du Nanopore early access program) est en cours.

Targetted sequencing :

Plusieurs approches de séquençage ciblé ont été développées et/ou évaluées afin de répondre à plusieurs besoins.

Un premier besoin était d'avoir une méthode moléculaire capable de mettre en évidence des co-infections multi-espèce et/ou multi ST directement à partir des prélèvements cliniques des patients. Dans ce contexte nous avons développé une approche par PCR multiplex (3 PCR triplex) ciblant la région intergénique 23S-5S ainsi que les 7 gènes du SBT ; les amplicons étant par la suite séquencés par technologie Illumina®. Ce workflow permet simultanément de mettre en évidence des co-infections multi-espèce et/ou multi ST.

Une approche par PCR simplex / NGS ciblant la région intergénique 23S-5S a également été mise en place dans le cas de suspicions de co-infection uniquement multi-espèces. Cette approche nous a permis de mettre en évidence 2 co-infections multi-espèce (*Lp8 / L. micdadei* et *Lp / L. longbeachae*)

Dans le contexte de la détermination du microbiote intestinal et/ou respiratoire de patients atteints de légionellose, nous avons mis en place une amplification ciblée des régions V3-V4 de l'ARNr 16S procaryote et de la région ITS1 des eucaryotes suivi d'un séquençage Illumina® sur séquenceur Miseq.

La plus-value du séquençage de l'ensemble de l'ARN16 (V1-V9) via la technologie Nanopore a également été évaluée dans le cadre de la mise en place de ces analyses. Ce séquençage est réalisé avec la chimie 9.4.1 pour l'instant.

3.2.6 Constitution de banques de souches / matériels de référence

Le CNR dispose d'une collection importante de souches d'origine clinique et environnementale (cf 2.4.2) ainsi que d'ADN de *L. pneumophila* étalon international, matériel certifié (cf 3.2.4.1). Ces échantillons peuvent-être distribués à des laboratoires extérieurs pour des demandes particulières (étalonnage d'appareil, validation de méthodes en biologie médicale...). De plus, le CNR dispose de divers mutants notamment ceux construits pour l'étude des mécanismes de résistances aux antibiotiques (delta *dotA* avirulents résistantes aux macrolides (n=7), aux fluoroquinolones (n=9) et à la rifampicine (n=7)), des *Legionella* construites avec un plasmide exprimant mCherry ou GFP, des mutants pour divers facteurs de virulence.

Le CNR dispose également de sérums de lapins (Ac polyclonaux) pour l'identification des souches de *Legionella* et d'antigènes de l'ensemble des souches de *Legionella* utilisable pour la sérologie. En 2021, le CNR a réalisé de nouveau l'inoculation d'oeufs pour une question précise afin de ne pas perdre l'expertise.

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

En 2017, le CNR des légionelles a déménagé à l'hôpital de la Croix Rousse (69004). Le déménagement n'a entraîné aucun changement quant à ses collections de souches, prélèvements et ADN. Les congélateurs contenant ces collections ont été transférés pleins et dans des conditions permettant d'assurer leur conservation. Les échantillons distribués depuis sont les suivants :

En 2017 :

- 12 sérums positifs au CHU de Clermont Ferrand afin de l'aider dans sa démarche d'accréditation ;
- la souche de référence CIP107629 a été envoyée au CNR de Bruxelles

En 2018 :

- 16 souches de *Legionella* non *pneumophila* et 12 souches de *L. pneumophila* séro groupe non 1 ont été cédées au bureau technique AFNOR validation, dans le cadre d'une expertise pour le laboratoire AdGene, un laboratoire expert pour la validation de solutions alternatives aux méthodes normatives

En 2019 :

- souche *L. pneumophila* ATCC 12821 envoyée à Maria Luisa Ricci dans le cadre de la mise en place de la recherche de souches antibiorésistantes dans son laboratoire de Rome en Italie
- souches *L. pneumophila* Paris CIP 107629, HL 0709 3014 et LG 0724 5003 envoyées à Julien Verdon de l'Université de Poitiers

En 2020 :

- partage de séquence avec le Public Health England (Vicki Chalker) du génome de souches ST616. Ces souches isolées de patient de différents pays en Europe sont associées à des voyages à Dubaï.

En 2021 :

- souches (*L. erythra*, *L. birminghamensis*, *L. sainthelensi* et *L. pneumophila* séro groupe 15) au laboratoire de référence en Belgique
- 12 souches de *L. pneumophila* à Baharak Afshar (UK HSA) pour l'évaluation de nouveaux primers ciblant le gène *flaA* du SBT
- 960 souches à Xavier Charpentier dans le cadre du projet ANR Transconflict

S'ajoutent les distributions de matériel de référence décrit au chapitre 3.2.4.1.

3.2.8 Transfert des techniques vers des laboratoires

2018

G. Fleres : 26 février – 9 mars 2018, étudiant en thèse de l'Université médicale du Centre de Groningen, sous la supervision du Pr. Friedrich, The Netherlands. Interprétation de données de séquençage de souches de *L. anisa*.

Publication issue de ce travail : Fleres G, Couto N, Lokate M, van der Sluis LWM, Ginevra C, Jarraud S, Deurenberg RH, Rossen JW, García-Cobos S, Friedrich AW. *Microorganisms*. 2018 Jul 18;6(3). Detection of *Legionella anisa* in Water from Hospital Dental Chair Units and Molecular Characterization by Whole-Genome Sequencing.

2019

Edward Portal (Cardiff University, Royaume-Uni) : transfert de la technique d'antibiogramme par microdilution développé au CNR aboutissant à une publication commune associant l'ensemble des partenaires européens. Edward Portal a obtenu une bourse de l'ECDC attribuée pour les échanges entre pays de l'ELDSNet et permettant le transfert de technologie.

Legionella antibiotic susceptibility testing: is it time for international standardization and evidence-based guidance? Portal E, Descours G, Ginevra C, Mentasti M, Afshar B, Chand M, Day J, Echahdi F, Franzin L, Gaia V, Lück C, Meghraoui A, Moran-Gilad J, Ricci M, Lina G, Uldum S, Winchell J, Howe R, Bernard K, Spiller O, Chalker V, Jarraud S. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Apr 13;76(5):1113-1116.

Abdelwahid Assaidi (Institut Pasteur de Casablanca, Maroc) : transfert des techniques de typage des *Legionella* (PFGE, Mab subtyping, SBT et WGS).

Abstract pour ECCMID 2020 en collaboration avec l'université Sultan Moulay Slimane, Faculty des Sciences et des Techniques, Beni Mellal, Maroc, et l'Institut Pasteur du Maroc:

Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of *Legionella pneumophila* in hot water systems in Morocco. Abdelwahid Assaidi, Mostafa Ellouali, Hassan Latrache, Hafida Zahir, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud, Mostafa Mliji

3.2.9 Travaux de recherche appliquée en lien avec les activités du CNR

Les activités de recherche du CNR sont en lien avec l'équipe Pathogénèse des légionelles (Resp. Patricia Doublet, Co- resp. Sophie Jarraud) du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI, <http://ciri.inserm.fr>), dont 5 membres du CNR sont affiliés. Les projets de l'équipe sont centrés sur deux axes principaux, l'axe 1 sur des aspects de physiopathologie et génétique des populations et l'axe 2 sur l'étude des mécanismes moléculaires régulant le cycle infectieux de *Legionella pneumophila*.

Ne sont présentés ici que quelques travaux ayant un lien direct avec les missions du CNR avec comme origine des travaux les observations du CNR tirées des données cliniques, diagnostiques ou des caractéristiques des souches. Au cours des 5 dernières années, nous nous sommes particulièrement intéressés (i) aux facteurs influençant la sévérité des cas de légionellose et tentés d'identifier des biomarqueurs pronostiques de la légionellose, (ii)

3.2.9.1 Biomarqueurs bactériens et humains d'intérêt pronostique pour les légionelloses sévères (étude PROGLEGIO)

Il s'agit d'une grande étude nationale interventionnelle prospective coordonnée par le CNR dans le cadre du Programme de Recherche Translationnelle en Santé co-financé par l'ANR et la DGOS. L'objectif est d'identifier des marqueurs bactériens et d'hôte associés à l'évolution péjorative de la légionellose. Ce projet associe une recherche clinique et une recherche plus fondamentale. L'étude distingue deux groupes de patients, les patients hospitalisés en Unités de Soins Intensifs (USI) et ceux en hospitalisation simple. Une comparaison des paramètres est mesurée à J0 entre les patients dont la légionellose est classée sévère et non sévère. Un suivi longitudinal (clinique et biologique) est réalisé pour les patients hospitalisés en USI. Un total de 15 centres investigateurs participe au niveau national.

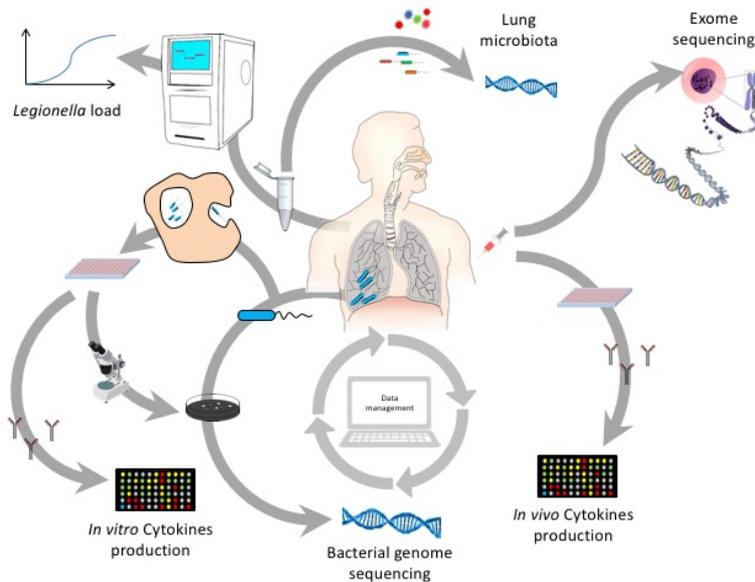


Figure 16 : Différentes approches utilisées dans l'étude ProgLegio

Parmi les marqueurs de sévérité, nous étudions :

- (1) l'émergence pendant le traitement d'une population de *Legionella* résistante aux antibiotiques, population notamment détectable par séquençage à haut débit ;
- (2) si l'évolution de la charge pulmonaire en *L. pneumophila* par PCR est associée à l'évolution clinique de l'infection ;
- (3) si un profil cytokinique spécifique au niveau local (pulmonaire) ou au niveau systémique (sérum) est associé à la sévérité ;
- (4) la diversité du microbiote pulmonaire en utilisant des approches de métagénomique et de NGS afin d'associer un microbiote spécifique ou son évolution à la sévérité de l'infection ;
- (5) si des gènes bactériens ou des *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) sont associés à la sévérité, identifiés par des analyses génomiques comparatives ;
- (6) les facteurs génétiques humains qui prédisposent à des infections sévères à Lp1 à l'aide d'une approche de séquençage global de l'exome.

En mars 2020, 100 patients ont été inclus dans l'étude et un total de 1279 échantillons dont 696 échantillons respiratoires ont été analysés et stockés au CNR. Les inclusions sont à ce jour de plus de 160 patients.

Sont présentés ici quelques résultats issus du CNR pouvant avoir un impact direct sur la compréhension de la physiopathologie de l'infection et sur les préconisations du CNR.

1. L'évolution péjorative de la légionellose n'a pas été associée à une résistance de *Legionella* aux antibiotiques ou à l'émergence pendant le traitement d'une population de *Legionella* résistante. La résistance a été évaluée pour 98 souches (58 patients) par méthode phénotypique (macrolides, fluoroquinolones, doxycycline et rifampicine) et par recherche de mutations sur la cible de l'antibiotique d'intérêt (gènes *gyrA*, *rrl*, *rplD* et *rpN*, *rpoB*) sur les génomes complets (souche initiale et terminale) et par PCR directement sur prélèvements cliniques. Aucune résistance phénotypique ni mutation des différentes cibles testées n'a été mise en évidence. Plus globalement nous n'avons pas identifié d'évolution des génomes de *Legionella* au cours de l'infection : ni SNPs, ni réarrangements chromosomiques ou d'événements de recombinaison entre les souches initiales et terminales (Illumina Nextseq500 ou technologie Nanopore) (données inclus dans § 3.3).

2. Les patients sévères ont des taux d'ADN de *Legionella* dans les poumons et le sérum en phase initiale significativement supérieurs aux autres patients. La PCR *L. pneumophila* était positive pour 84% (83/99) des prélèvements pulmonaires à la phase initiale (J0 = 0 à 3 jours après le diagnostic) et une persistance de la culture et de la détection de l'ADN jusqu'à J14 ou plus pour les patients les plus sévères. Les patients les plus sévères (score SOFA ≥ 5) avaient des taux d'ADN de *Legionella* dans les poumons supérieurs aux autres patients à J0 (Figure 17) et les taux d'ADN sériques étaient corrélés à la quantité d'ADN au niveau du site de l'infection. De façon intéressante, la PCR sérique était positive pour 48% des patients (52/109). Par ailleurs, la positivité à J0 était associée à une sévérité plus importante à J8 et à une durée de séjour en réanimation plus importante. La positivité de la PCR sérique

pourrait être un biomarqueur simple pour identifier les patients les plus sévères. Néanmoins, la charge bactérienne ne semble pas expliquer à elle seule la sévérité de l'infection (résultats en partie présentés au congrès RICAI 2019 et ESGLI 2019).

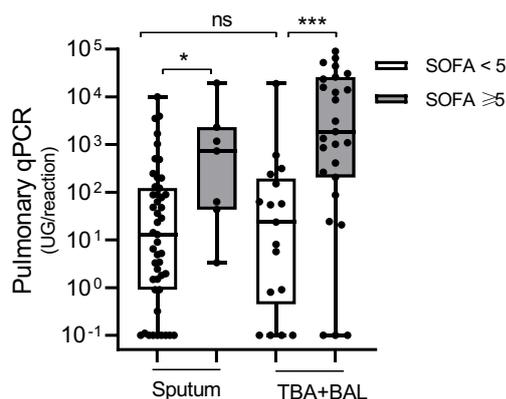


Figure 17 : Taux d'ADN pulmonaire à J0 en fonction de la sévérité des patients à J0 (TBA : Tracheo-Bronchial aspirate et BAL : Broncho Alveolar Lavage)

3. Une « tempête cytokinique » initiale au niveau systémique est associée à la sévérité de la légionellose. Le dosage de 19 cytokines circulantes à J0 (n=86) après le diagnostic montre une sécrétion significativement plus intense pour les patients sévères (score SOFA ≥ 5) des chimiokines (MCP1 et MIP1b) et des cytokines pro-inflammatoires (IL6, IL8 et TNF α). L'immunité adaptative est également affectée avec un niveau significativement plus élevé de cytokines Th-1 (TNF α et IFN γ). Au contraire, la sécrétion d'IL-7, IL-12 et IL-18 est identique ou plus faible chez les patients sévères. Ce profil cytokinique particulier a été également associé à la PCR sérique (résultats en partie présentés au congrès ESGLI en 2019 et SFM 2019).

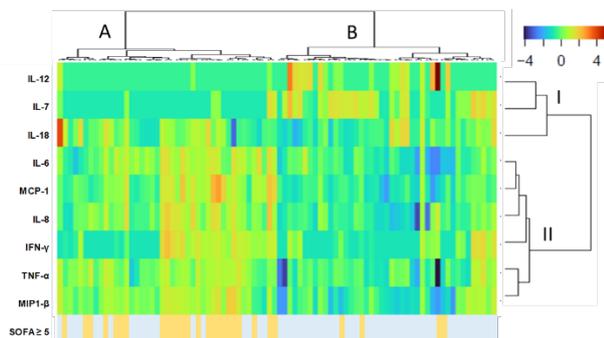


Figure 18 : Heat-map représentant la sécrétion plasmatique des cytokines différemment exprimées chez les patients sévères par rapport aux non-sévères et la sévérité

4. Etude de l'évolution du microbiote lors des légionelloses. Suite à la description des légionelloses persistantes, une collaboration avec l'équipe Biologie des Bactéries Intracellulaires (C. Buchrieser, CNRS UMR 3525, Institut Pasteur, Paris) a permis de décrire la dynamique du **microbiome pulmonaire (bactéries, archées, champignons et protozoaires)** au cours de légionelloses persistantes sur plusieurs semaines ainsi que son évolution pendant le traitement antibiotique par l'analyse de 11 échantillons (9 BAL, 1 expectoration et 1 abcès pulmonaire) issus de 3 patients. Le microbiome était caractérisé aux premiers stades de l'infection par une forte prédominance de l'agent pathogène *Legionella* (~75% de la diversité totale), une faible diversité de la fraction bactérienne et une présence accrue de microorganismes opportunistes. Au cours de l'antibiothérapie, le microbiome ne se rétablit pas rapidement avec une prévalence de micro-organismes opportunistes et/ou résistants aux antibiotiques ainsi que de champignons souvent associés aux infections, qui pourraient tirer parti des réponses inflammatoires de l'hôte induites par l'infection. L'identification pour la 1^{ère} fois d'archées et de protozoaires (incluant *Acanthamoeba*, hôte environnemental naturel des *Legionella*) dans tous les échantillons suggère qu'ils pourraient également jouer un rôle dans le pronostic de l'infection. Cette étude a débuté en 2018, s'est poursuivie en 2019 pour une publication en 2020 dans mBio : Persistent Legionnaires' Disease and Associated Antibiotic Treatment Engender a Highly Disturbed Pulmonary Microbiome Enriched in Opportunistic Microorganisms. Ana Elena Pérez-Cobas, [Christophe Ginevra](#), [Christophe Rusniok](#), [Sophie Jarraud](#), [Carmen Buchrieser](#).

L'analyse de 183 échantillons (15 LBA, 42 expectorations et 125 aspirations trachéales) issus de 50 patients de l'étude ProgLegio est en cours dans l'objectif d'identifier un potentiel microbiote associé à la sévérité des légionelloses.

La caractérisation du virome pulmonaire chez les patients atteints de légionellose totalement inconnu à ce jour, et de sa dynamique a été initiée par l'étude de 64 échantillons respiratoires (à J0 et en suivi longitudinal) selon un protocole adapté du protocole NetoVIR (Novel enrichment technique of VIRome) chez des patients atteints de légionellose sévère et non sévère. Ce travail a été présenté en communication orale à la SFM 2021 et en eposter à l'ECCMID 2021 et à l'ICCMg 2021 (Characterisation of the lung virome in patients with Legionnaires' disease. Marine Ibranosyan, Christophe Ginevra, Bruno Simon, Grégory Destras, Hadrien Regue, Camille Allam, Laetitia Beraud, Antonin Bal, Ghislaine Descours, Laurence Josset, Sophie Jarraud).

Méthode Un protocole de métagénomique virale shotgun a été réalisé sur 63 échantillons respiratoires (expectorations (n=23), aspirations trachéobronchiques (ATB, n=38) et lavages bronchoalvéolaires (LBA, n=2)). Les échantillons ont été collectés entre janvier 2018 et janvier 2020 chez 33 patients atteints de légionellose inclus dans une étude de cohorte prospective multicentrique française (ProgLegio) qui nous a permis d'accéder à des données cliniques et biologiques. Parmi eux, 16 patients (48%) étaient sévères selon un score SOFA ≥ 5 . Trente-trois échantillons étaient des échantillons initiaux (jour 0, J0) et 30 étaient des échantillons de suivi (de J3 à J21). Le protocole de métagénomique comprenait la purification et l'enrichissement viral, l'amplification aléatoire et le séquençage Illumina sur NextSeq 550.

Résultats Un total de 27 familles virales a été identifié dans les échantillons respiratoires des patients atteints de légionellose, dont 21 familles virales eucaryotes et 6 familles de bactériophages. La diversité virale était significativement plus élevée dans les expectorations que dans le ATB/LBA ($p=0,0001$). Une prévalence plus élevée des 8 familles suivantes a également été retrouvée dans les expectorations : *Herpesviridae* ($p=0,001$), *Papillomaviridae* ($p=0,0002$), *Circoviridae* ($p=0,0233$), *Polyomaviridae* ($p=0,0434$), *Picobirnaviridae* ($p=0,0233$), *Alphaflexiviridae* ($p=0,0024$), *Phycodnaviridae* ($p=0,0373$) et *Siphoviridae* ($p=0,0032$). Les *Herpesviridae* ont été détectés chez 22 patients (67%) ; parmi eux, 8 sont devenus positifs au cours du suivi. Les réactivations d'*Herpesviridae*, confirmées par des tests sérologiques, pourraient être liées à l'immunosuppression et/ou à l'intubation orotrachéale.

Conclusions Les données sur le virome pulmonaire au cours de la légionellose ont montré une grande variété de familles virales et dépendent du type d'échantillon (expectorations versus ATB/LBA), ce qui est cohérent avec les résultats du bactériome dans la légionellose. D'autres études sont nécessaires pour examiner le rôle du virome respiratoire sur la sévérité de la légionellose.

LPS de *Legionella pneumophila* et réponse immunitaire innée

Nous nous sommes également intéressé à l'étude de la réponse immunitaire innée au LPS de *Legionella* en fonction des souches dans l'objectif d'une meilleure compréhension de la prévalence de certaines souches dans les cas de légionellose.

Le LPS de souches de *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 a été obtenu par une technique d'extraction et de purification, technique mise au point par le laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Equipe Microbiologie de l'eau de Poitiers (Julien Verdon et Jean-Marc Berjeaud). Ces LPS ont été testés pour étudier la réponse immunitaire innée au LPS sur un modèle de cellules modifiées THP-1 X-Blue (lignée monocyttaire différenciable en macrophages, exprimant de manière stable une phosphatase alcaline SEAP sous contrôle d'un promoteur inductible par les facteurs de transcription du NF- κ B). Les LPS ont été extraits de souches environnementales, jamais décrites en clinique humaine à ce jour, et différentes souches cliniques : souches fréquemment isolées en pathologie humaine (souche Paris, Lorraine, et autres souches cliniques présentant l'épitope mAb3/1+) et d'autres souches moins fréquemment impliquées dans des cas de légionellose (souches ne présentant pas l'épitope mAb3/1). Les résultats sur ce modèle cellulaire montrent une tendance à l'activation du NF- κ B plus importante pour les souches environnementales ou peu impliquées en clinique que pour les souches plus pathogènes. Cette différence d'activation de l'immunité innée est en cours d'investigation sur d'autres modèles cellulaires. Elle semble cependant en faveur d'une activation plus importante de l'activité innée par des souches peu pathogènes, pouvant être à l'origine d'une meilleure clairance de ces souches.

3.2.9.2 Travaux sur la résistance de *Legionella* aux antibiotiques

* Résistance aux macrolides

Nos travaux antérieurs sur la résistance de *L. pneumophila* aux macrolides (sélection de mutants résistants *in vitro*) par des mécanismes ribosomiques ont été publiés en début de mandat 2017-2021 :

Descours G, Ginevra C, Jacotin N, Forey F, Chastang J, Kay E, Etienne J, Lina G, Doublet P, Jarraud S. Ribosomal mutations conferring macrolide resistance in *Legionella pneumophila*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2017;61(3).

Les travaux ayant permis d'identifier un mécanisme de résistance additionnel par pompe à efflux Lpp2879-Lpp2880 (ou LpeAB) et d'identifier l'impact de mutations observées dans des mutants résistants sur l'expression de LpeAB par fusion traductionnelle avec la protéine GFP ont été également publiés en début de mandat :

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

Ces résultats ont été complétés par la construction de mutants chromosomiques possédant ces deux mutations, ainsi que celle d'un double mutant (encadrement de 2 étudiantes en Master 1, 2017-2019). Nous avons validé l'impact des mutations dans la diminution de la sensibilité de *L. pneumophila* aux macrolides. Une analyse transcriptomique ciblée sur LpeAB a permis de confirmer que les mécanismes associés à cette surexpression étaient d'ordre transcriptionnel ou traductionnel en fonction de la nature de la mutation. Comme observé pour d'autres genres bactériens, le rôle de protéines de choc thermique (ici CspC) dans l'expression de cette pompe à efflux a également été démontré.

Enfin, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la présence de LpeAB pourrait favoriser l'infectiosité bactérienne et/ou la sélection de mutants résistants ribosomiques de plus haut niveau. Seule la première hypothèse a été validée (données non publiées).

* Résistance aux fluoroquinolones

En collaboration avec le CHU de Grenoble (Pr Max Maurin), nous avons développé une technique de dPCR permettant la détection de mutants résistants aux fluoroquinolones (mutations sur *gyrA*) à partir d'un prélèvement. Les performances de cette technique ont été comparées à celles d'une PCR suivie d'un séquençage Sanger ou d'une PCR quantitative. Nous avons montré que la dPCR permettait de détecter des sous-populations résistantes aux fluoroquinolones de l'ordre de 1/1000 parmi une population sauvage, versus 1/1 et 1/10 par les deux autres techniques évaluées respectivement.

Ces résultats ont donné lieu à la publication suivante :

Hennebique A, Bidart M, Jarraud S, Beraud L, Schwebel C, Maurin M, Boisset S. Digital PCR for Detection and Quantification of Fluoroquinolone Resistance in *Legionella pneumophila*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2017 Aug 24;61(9).

Enfin, afin de disposer d'une collection de souches résistantes aux antibiotiques (en particulier lors de l'évaluation de kits commerciaux pour antibiogramme), nous avons sélectionné un panel de mutants avirulents possédant différents niveaux de résistance aux fluoroquinolones (encadrement d'Anaëlle Bolon, stage hospitalo-universitaire, 2019-20).

3.3 CONSEIL AUX PROFESSIONNELS ET AUX AUTORITES DE SANTE

3.3.1 Production et contribution aux guides, recommandations

* **European Guidelines Legionella dans le contexte COVID.** Lors de la pandémie, nous avons souhaité au niveau européen alerté sur le risque de contamination en *Legionella* des réseaux d'eau lors des confinements successifs et en conséquence du risque de légionellose lors de la réouverture de ces établissements fermés.

En sept 2020, le groupe ESGLI (ESCMID Study Group for *Legionella* Infections) a édité sur le site de l'ESCMID différents guides européens pour la gestion des *Legionella* durant la pandémie ; le CNR a participé à la rédaction/relecture de 3 de ces guides de recommandation pour les établissements hospitaliers, les maisons de repos et de soins, et les grands bâtiments lors de la ré-ouverture ou de l'utilisation à minima des bâtiments (> 3500 téléchargements en 2020) : https://www.escmid.org/research_projects/study_groups/legionella_infections/

- ESGLI Guidance for managing *Legionella* in nursing & care home water systems during the COVID-19 pandemic
- ESGLI Guidance for managing *Legionella* in hospital water systems during the COVID-19 pandemic
- ESGLI Guidance for managing *Legionella* in building water systems during the COVID-19 pandemic

*Relecture en 2018 avec le groupe ESGLI du "Legionella WHO microbial fact sheets for the drinking-water and sanitation guidelines" – chapitre sur *Legionella* spp.

*** Participation à la discussion avec SpF de la place de la PCR dans la définition des cas certains de légionellose au niveau national à l'instar des discussions qui ont eu lieu au niveau européen en 2019.**

***Participation à la discussion avec SpF** de la révision **du formulaire de MDO** de la légionellose en 2019, des informations à recueillir sur le formulaire de notification pour la surveillance et des items cliniques et biologiques à inclure. A noter que SpF collabore avec la DGS et les ARS sur le projet de mise en ligne des MDO sur le portail des signalements. La demande d'accès des CNR sur la base nationale de MDO est intégrée dans les discussions.

*** Prévention des cas à *L. longbeachae*.** Nous avons été en contact étroit avec différentes ARS sur les questions de prévention du risque de contamination pour des patients pour lesquels le jardinage était une activité importante. Nous avons contacté le CNR d'Ecosse (Diane Lindsay), expert sur cette thématique en Europe diagnostiquant de nombreux cas à *L. longbeachae* pour connaître leurs recommandations sur ce point. Elles reposent principalement sur quelques conseils d'hygiène simples concernant le stockage et la manipulation du compost, et le mélange de rempotage pour les patients à risque : il est recommandé le port de masque anti-poussière, de gants, le lavage des mains à la fin des travaux, et l'ouverture des sacs de compost dans des endroits bien ventilés.

3.3.2 Activité de conseil et d'expertise

*** Conseils aux professionnels**

Conseils téléphoniques ou par courriers électroniques (en moyenne de 1 à 10 conseils par jour) essentiellement pour les microbiologistes et cliniciens (conseil diagnostique, résultats des évaluations de kits, conseils thérapeutiques, informations sur les méthodes de typage), ARS (interprétation des résultats, information sur les méthodes de typage, conseil), médecins du travail sur les informations à donner aux personnels en cas de légionellose ou de dépassement de seuils environnementaux, et EHOP sur les méthodes de décontamination des sites. Des avis réguliers sont donnés sur les tests évalués par le CNR (kits urinaires, sérologie ou PCR) ainsi que des conseils techniques (méthodologie, choix milieux de culture, chauffage des urines, sensibilité aux antibiotiques ...). Les appels téléphoniques sont redistribués au biologiste responsable du CNR (au moment de l'appel / responsabilité prise de façon hebdomadaire par l'ensemble des biologistes) par les secrétaires (standard téléphonique).

Des courriers réponse individuels et spécifiques pour chaque souche d'origine clinique sont adressés au laboratoire d'envoi et pour chaque investigation à l'ARS et au laboratoire d'envoi ; des courriers sont également adressés pour les cas de diagnostic difficile (près de 3800 courriers de 2017 à 2021).

*** Proposition d'algorithme pour le diagnostic** – Le CNR recommande depuis de nombreuses années la PCR comme outils de première ligne pour le diagnostic des légionelloses au même titre que la détection des antigènes urinaires. Cette recommandation est d'autant plus vraie pour les patients immunodéprimés ou les cas nosocomiaux (patients pour lesquels les légionelloses à *L. non pneumophila* sont plus fréquentes). Ces recommandations ont été diffusées par différents moyens (guide, congrès, REMIC ...).

Les recommandations et exigences pour la conservation et l'envoi des souches et des prélèvements au CNR sont précisées dans le guide : « risques liés aux Légionelles – Guide d'investigation et d'aide à la gestion » HCSP (2013).

Communications

- Participation à la Journée régionale de formation sur le risque infectieux lié à l'environnement, 10 Octobre 2017, Tours : La légionellose en France aujourd'hui – S. Jarraud
- ARS Rhone-Alpes Auvergnnes, 23 Mars 2017 : "rencontre ARS - intervention CNR légio". (Anne Gaëlle Ranc et Laetitia Beraud)
- Communication pédagogique pendant le congrès européen ELDSNET 2018 « *Legionella pneumophila* typing: From Sequence-based typing to whole genome sequencing » (C. Ginevra)
- JPIAS 2019 – Journée de Prévention des Infections Associées aux Soins – Présentation orale intitulée « prévention du risque lié aux légionelles, point sur la légionellose nosocomiale et cas pratiques » (16 mai 2019, C. Allam)
- Conférence master Class Pall, 24 Sept 2019 « conception, réalisation, surveillance et sécurisation des réseaux d'eau des établissements de santé », Hotel Golden Tulip Lyon Eurexpo – La légionellose en chiffre, 2018 (S. Jarraud).
- 8^{ème} journée du GREPI (Groupe pour la recherche et l'enseignement en Pneumo-infectiologie) en format digital- « Etat des lieux de la Légionellose, épidémiologie et prise en charge », 26-27 Novembre 2020 (30 min S Jarraud).
- SF2H 2021, La légionelle dans tous ses états, épidémiologie et résistance (session SFM), 4-6 Octobre 2021, Nantes (S. Jarraud)
- Webinar One health SFM, Environnement et pathogènes : des liaisons dangereuses?, 25 mars 2021, 9h – 12h. Impact de l'environnement sur la pathogénicité de *Legionella*. Webinar organisé par la section Microbiologie environnementale de la SFM
- Webinar SFM Le Remic's, Webinars de microbiologie clinique qui reprennent les chapitres du REMIC : *Legionella*, Juin 2021
- Communication pendant la journée « actualités du diagnostic de la légionellose » organisée par ARS et CPIAS PACA (30 min C. Allam 02 décembre 2021- Nice)

*** Conseil pour d'autres cibles (médias, grand public ...)**

2017 – Interview France 3 pour 2 cas de légionellose diagnostiqués à Oullins (proche Lyon) alors que des *Legionella* avaient été détectées dans la piscine : information générale sur les risques liés aux légionelles.

2018 – Programme INSERM « Les chercheurs accueillent les malades », Maladies allergiques et inflammatoires pulmonaires, le 19 Juin 2018. Accueil d'une vingtaine de patients aux CNR, visite du CNR et discussion autour du rôle et des analyses réalisées au CNR ainsi que des activités de recherche appliquée pouvant être bénéfique pour les patients à court, moyen et long terme.

2020 – Le progrès Auvergnnes-Rhône Alpes 12 février 2020 – Légionellose : le pic de 2018 garde une part de mystère

2020 – Ouvrage pour grand public :

- S. Jarraud et J. Etienne. *Legionella*, une bactérie naturelle de l'environnement hydrique, responsable de la légionellose, une maladie de la modernité in Le défi des maladies infectieuses Des pestes à la COVID-19, Sous la direction de P. Cramer et A. Meigien, Les Editions du Palais, Edition Docis, Nov 2020

3.3.3 Conseils aux autorités de santé nationales

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

HCSP

- Membre du groupe de travail du Haut Conseil de la Santé Publique – Avis sur projet de décret relatif à la prévention des risques sanitaires liés aux systèmes collectifs de brumisation d'eau, et le décret qui en découle : Décret n° 2017-657 du 27 avril 2017 relatif à la prévention des risques sanitaires liés aux systèmes collectifs de brumisation d'eau (S. Jarraud)
- 2021 : audition dans le cadre de la saisine conjointe du 27 mai 2020 relative à l'évaluation globale des PNSE et des indicateurs de suivi du PNSE4 (audition le 22 Juin 2021, S. Jarraud)

ECDC - Nomination comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen pour l'ECDC (Sophie Jarraud, depuis 2010)

Le CNR collabore avec le réseau européen de surveillance des légionelloses **ELDSNet** (European Legionnaires' Disease Surveillance Network). SpF (Christine Campese) est au comité de coordination de ELDSNet et nous échangeons régulièrement sur les différents points abordés

EUCAST - Membre du Steering committee de l'EUCAST (Gérard Lina)

ESCMID – ESGLI - forte implication au groupe d'étude ESGLI (ESCMID Study group for *Legionella* Infections). Membre du comité exécutif (Présidente 2020 – 2022, trésorière (2016-2020 et depuis 2022), S. Jarraud). Participation aux réunions du comité exécutif (1 fois / mois) en distanciel.

Du fait de la non organisation du congrès européen ESGLI annuel en 2020, le comité exécutif a mis en place des webinars d'une heure qui ont démarré en 2021.

Webinar #1

- The new drinking water directive by Dr Maria Luisa Ricci
- cgMLST analysis of *L. pneumophila* ST-23 by Dr Maria Scatturo.
- UK COVID-19 lockdown and Legionella colonisation: the effect of chlorine dioxide disinfection on temporarily out-of-use buildings by Gary Hogben (Feedwater)

Webinar #2

- Legionella trends in the EU/EAA by Dr Lara Payne
- Legionella and SARS-Cov-2 in France in 2020 by Sophie Jarraud
- Legionella in the time of Covid by Dr Nancy Flountzi

Webinar#3 - Legionella diagnosis and beyond

- What is the risk of missing legionellosis relying on urinary antigen testing solely? A retrospective Belgian multicenter study by Astrid Muyldermans
- Multi-criterion analysis and the effect of multiple factors on the presence of Legionella in water systems of hotel units in Crete by Dr Dimosthenis Chochlakis
- Laboratory surveillance of Legionnaire's Disease in Portugal: perspective of the National Reference Laboratory for Legionella by Dr Paulo Goncalves

Dans le domaine de l'environnement

DGS/DGPR – Nous avons été sollicité par la DGS/DGPR (Marjorie Brou) concernant le 4ème Plan National Santé Environnement (PNSE 4) et plus spécifiquement l'action n°12 « mieux comprendre et prévenir les cas de légionellose » et l'exploration de la part potentielle des cas de légionellose due aux contaminations à domicile. Des contacts réguliers ont eu lieu depuis fin 2021.

ANSES – groupe de travail « q-PCR légionelles » dont l'objectif est l'analyse d'un rapport mandaté par le ministère de l'écologie relatif à la pertinence des méthodes analytiques par culture et par q-PCR pour le contrôle réglementaire des eaux de circuits de refroidissement des tours aéroréfrigérantes (6 réunions à l'ANSES en 2017, Maud Baume).

ANSES-DGS - Echange avec la DGS et collaboration avec le laboratoire d'hydrogéologie de l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) (Thierry Chesnot) pour d'évaluer la fiabilité des résultats présomptifs pour les analyses de *L. pneumophila* obtenus selon la norme NF T 90-431 à J5 ou J7 post-ensemencement.

OMS-Europe, CEE-NU. Participation aux réunions des Parties du Protocole sur l'eau et la santé (sollicitation par la DGS/bureau des eaux, Yannick Pavageau) en Serbie 2019 (présentation *au side-event* en tant qu'expert et représentant l'Europe) et on line en 2021 à la réunion d'expert sur la prévention et le control des légionelloses dans la région pan – Européenne).

AFNOR - Membre de la commission de Normalisation AFNOR T90D Microbiologie des eaux (Maud Baume).

2019- Review du rapport “*Management of Legionella in Water Systems,*” from the National Academies' Water Science and Technology Board.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Division on Earth and Life Studies; Board on Population Health and Public Health Practice; Board on Life Sciences; Water Science and Technology Board; Committee on Management of Legionella in Water Systems. Management of Legionella in Water Systems. Washington (DC): National Academies Press (US); 2019 Aug 14. The National Academies of SCIENCES • ENGINEERING • MEDICINE. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555117/>

3.3.4 Production d'outils de rétroinformation (site internet ...)

Site internet : le CNR dispose d'un site web (<http://cnr-legionelles.univ-lyon1.fr>) qui présente notamment les activités du CNR, le mode de fonctionnement, les modalités d'envois, les fiches à télécharger, et les personnes à contacter. Des fiches de renseignement par exemple sur le typage des souches de légionelles à la recherche de la source de contamination sont renseignées. Des fiches de demande d'analyses dédiées aux laboratoires ou aux ARS peuvent être téléchargées directement sur le site et envoyées par messagerie électronique.

Un site spécifique dédié à l'étalon ADN a été réalisé en Français et en Anglais dans l'objectif d'une distribution européenne de cet étalon. Ce site est accessible par la page d'accueil du site web du CNR. Il est indexé dans google.

Organisation d'un Congrès Européen :

Le CNR a organisé le congrès européen ESGLI 2018 à Lyon du 28 au 30 août 2018 (<http://esgli2018.univ-lyon1.fr>). Il a réuni 210 personnes venant de 25 pays (France, USA, Canada, Japon, Chine, Australie, Nouvelle-Zélande, Israël, Algérie, Maroc, Tunisie, Malte, Espagne, Portugal, Italie, Suisse, Allemagne, Autriche, Hollande, Danemark, Irlande, Finlande, Suède, Belgique, Emirats Arabes Unis).

Autres modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR

- Sur le site **web EWGLI** : mise en ligne de nos **données de SBT** dans la base de données européennes de SBT
- **Publication commune avec SpF des données de surveillance dans le BEH** : La légionellose en France: importante augmentation du nombre de cas en 2018.
Christine Campèse (christine.CAMPESE@santepubliqueffrance.fr), [Ghislaine Descours](#), Sibylle Bernard-Stoecklin, [Laetitia Beraud](#), Catherine Maine, [Anne-Gaelle Ranc](#), [Christophe Ginevra](#), [Sophie Jarraud](#). 11 Feb 2020, BEH 4.
- Conseil par le biais de chapitre d'ouvrage dans des **référentiels ou des livres faisant référence**
 - o Hugo Testaert, Florence Ader, Sophie Jarraud. Legionelloses EMC Maladie Infectieuse, Juillet 2019, Ed Elsevier Masson SAS 2019 ; [8-021-A-10] - Doi : 10.1016/S1166-8598(19)86672-3
 - o *Legionella*, Rémic édition, 5^{ème} édition 2018
 - o Laetitia Beraud, Anne-Gaelle Ranc, Ghislaine Descours, Gérard Lina, Sophie Jarraud. Legionella, EMC Biologie médicale, Ed Elsevier 2018 ;0(0) :1-12 [Article 90-05-0195-A].
- **Les données de surveillance** peuvent être publiées en collaboration avec d'autres institutions notamment SpF dans des journaux internationaux à comité de lecture :
 - o Co-infection with *Legionella* and SARS-CoV-2, France, March 2020. [Allam C](#), [Gaymard A](#), [Descours G](#), [Ginevra C](#), [Josset L](#), [Bouscambert M](#), [Beraud L](#), [Ibranosyan M](#), [Golfier C](#), [Friggeri A](#), [Lina B](#), [Campese C](#), [Ader F](#), [Jarraud S](#). Emerg Infect Dis. 2021 Nov;27(11):2864-2868.
 - o Transmission of Legionnaires' Disease through Toilet Flushing. [Couturier J](#), [Ginevra C](#), [Nesa D](#), [Adam M](#), [Gouot C](#), [Descours G](#), [Campèse C](#), [Battipaglia G](#), [Brissot E](#), [Beraud L](#), [Ranc AG](#), [Jarraud S](#), [Barbut F](#). Emerg Infect Dis. 2020 Jul;26(7):1526-1528.
- Diffusion par la **présentation des travaux et données de surveillance aux congrès** nationaux (RICAI, SFM, SF2H, JNI, journées GREPI), européen et international (congrès ECCMID, ESGLI, congrès internationaux sur *Legionella*, ICCMg), au réseau European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSnet) ...

3.3.5 Enseignement, formation, accueil de stagiaires

3.3.5.1 Enseignements et formations

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

- Le module de formation initiale des ingénieurs d'études sanitaires, Ecole des hautes études en santé publique (EHESP), Rennes : Les méthodes de détection des légionelles (antigénurie, culture et techniques moléculaires, typage des souches, limites des techniques, tous les ans 2017, 2018, 2020 et 2021 (S. Jarraud)
- Le module de formation « Epidémiologie moléculaire appliquée à la surveillance et au contrôle des maladies infectieuses » de l'InVS – Application des méthodes d'épidémiologie moléculaires et leurs limites dans la surveillance et les investigations d'épidémies de légionellose (1h30), 6 mars 2018, Santé publique France (S. Jarraud et C. Campese)

Formation universitaire sur le thème de *Legionella*

- Master "Infectiologie Cellulaire et Moléculaire, Vaccinologie", module "Contaminations Microbiennes et Santé publique", la vie des *Legionella* de l'amibe au macrophage, de Médecine de Tours, tous les ans (S. Jarraud).
- UE bactériologie et pathologie, Master 1, École Supérieure de Biologie-Biochimie-Biotechnologies, Université catholique de Lyon. *Legionella* et légionellose, tous les ans (S. Jarraud)
- UE Physiopathologie des Maladies Transmissibles, Université Lyon 1, Réplication intracellulaire d'une bactérie environnementale – exemple de *Legionella*, tous les ans (S. Jarraud)

3.3.5.2 Accueil de stagiaires

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

* Stagiaires professionnels

2020

- Lise URSAT, 2^{ème} année DUT Génie Biologique – Analyses Biologiques et Biochimiques, Université de Lyon, stage de 6 semaines, évaluation des plaques Micronaut-S pour l'antibiogramme de *Legionella pneumophila* séro groupe 1
- Amélie PACCAUD, 2^{ème} année DUT Génie Biologique – Analyses Biologiques et Biochimiques, Université de Lyon, stage de 6 semaines, évaluation des plaques Micronaut-S pour l'antibiogramme de *Legionella pneumophila* séro groupe 1
- Manon Crépin : Stage IUT 8 semaines, observation de l'activité du CNR, participation à un projet de recherche en lien avec le CNR (Croissance intracellulaire de différentes souches de Légionelles)

2017 : Sylvie Ivanoff, technicienne du laboratoire environnemental du CH de Montpellier : techniques de diagnostic et typage réalisé au CNR ainsi que les dispositions mise en place pour l'accréditation (2 jours)

* Stagiaires étudiants pour le transfert de technique

2018

G. Fleres : 26 février – 9 mars 2018, étudiant en thèse de l'Université médicale du Centre de Groningen, sous la supervision du Pr. Friedrich, The Netherlands. Interprétation de données de séquençage de souches de *L. anisa*.

Publication issue de ce travail : Fleres G, Couto N, Lokate M, van der Sluis LWM, Ginevra C, Jarraud S, Deurenberg RH, Rossen JW, García-Cobos S, Friedrich AW. *Microorganisms*. 2018 Jul 18;6(3). Detection of *Legionella anisa* in Water from Hospital Dental Chair Units and Molecular Characterization by Whole-Genome Sequencing.

Dr Kahina SOUAMI : Nous avons poursuivi en 2018 une collaboration initiée en 2016 avec le. L'objectif de cette collaboration est de développer le diagnostic de légionellose à Alger afin de connaître l'incidence et d'identifier des sources de contamination.

Cette collaboration a permis la réalisation d'un poster au congrès européen ESGLI : K.Y.Souami, S.Taghight-Mah, S.Uldum, R.F.Petersen, S.Jarraud, O.Tizarouine, D.T. Haddadi ,N.Boudjemline, S.M. Guettouche, H. Ammari, D.Yala, M. Ghaffor. *Legionella pneumophila* at Mitidja area (Algiers and neighbourhood), Algeria. 5th ESGLI Conference, Lyon, 28-30 August 2018.

Le travail plus ciblé sur le diagnostic de la légionellose à Alger et la caractérisation des cas de légionellose devraient permettre une publication commune.

2019

Edward Portal (Cardiff University, Royaume-Uni) : transfert de la technique d'antibiogramme par microdilution développé au CNR aboutissant à une publication commune associant l'ensemble des partenaires européens soumise dans *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (en 2020)

Legionella antibiotic susceptibility testing: is it time for international standardization and evidence-based guidance?

Portal, Edward ; Descours, Ghislaine; Ginevra, Christophe; Mentasti, Massimo; Afshar, Babarak; Chand, Meera; Day, Jessica; Echahdi, Fedoua; Franzin, Laura; Gaia, Valeria; Lück, Christian; Meghraoui, Alaeddine; Moran-

Abdelwahid Assaidi (Institut Pasteur de Casablanca, Maroc) : transfert des techniques de typage des *Legionella* (PFGE, Mab subtyping, SBT et WGS).

- Abstract pour ECCMID 2020 en collaboration avec l'université Sultan Moulay Slimane, Faculty des Sciences et des Techniques, Beni Mellal, Maroc, et l'Institut Pasteur du Maroc: Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of *Legionella pneumophila* in hot water systems in Morocco. Abdelwahid Assaidi, Mostafa Ellouali, Hassan Latrache, Hafida Zahir, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud, Mostafa Mliji
- Rapporteuse de sa thèse d'Université : « Etude de la contamination des eaux chaudes sanitaires par *Legionella pneumophila* dans les établissements hôteliers du Maroc », 2020

* Travaux étudiants en lien avec CNR

De nombreux étudiants sont accueillis chaque année au CNR issus de 5^{ème} année Hospitalo Universitaire de Pharmacie, Master 1 « Sciences du Vivant » (EPHE Paris), de DUT, BTS. Ces étudiants formés participent aux activités d'évaluation de kits, d'outils ou de développement de méthodologie.

Depuis 2017 ont été accueillis : Clarisse Foucry-Brach et Mathilde Rolly, Coralie Espinasse, Thomas Jugla, Clémence Pinatel, Anaëlle Bolon, Lise Ursat, Amélie Paccaud, Justine Lannes, Floriane Nhoung, Audrey Gauthier, Alice Montoya, Hanene Doudou.

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

Thèse d'Université, Université Claude Bernard Lyon 1

- Anne Gaëlle Ranc : « Phenol Soluble Modulins et lipopolysaccharide de *Legionella pneumophila* : rôle dans la réponse immunitaire innée » (mars 2014 – fev 2018) (Co-encadrement G. Lina, S. Jarraud)
- Camille Allam : « Etude des facteurs bactériens et d'hôte associés à la sévérité de la légionellose » (mars 2019 - oct 2022 (S. Jarraud)

Master

- Hugo Testaert : 2017-2018 « Impact of macrolides on innate response to *Legionella* and setting of a *Legionella* progonis interferon-gamma reactive assay » M2R « Infectiologie fondamentale », Université Claude Bernard Lyon 1 (S. Jarraud, F. Ader)
- Marine Ibranosyan : 2019-2020 « Caractérisation of Legionnaires disease patients' lung virome » M2R « Infectiologie fondamentale », Université Claude Bernard Lyon 1 (S. Jarraud, G. Descours)

3.4 CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE

3.4.1 Suivi des caractéristiques des agents et des infections

3.4.1.1 Interface avec SpF

Périodicité : Les échanges avec SpF sont pluri-hebdomadaires (téléphoniques, courriers électroniques, courriers postaux, interface de partage sécurisé) et ont pour objectifs : de valider les cas de légionellose posant problème ; de discuter des investigations en cours (résultats de typage, prélèvements adéquates à réaliser, etc) ; d'élaborer de nouvelles études ou analyses communes.

Données échangées : notification hebdomadaire du CNR à SpF des souches d'origine clinique reçues au CNR sous la forme d'un fichier Excel partagé et adressé sur une interface de partage sécurisé de SpF (<https://partage.santepubliquefrance.fr/file>). Chaque fin d'année, les données de ce fichier sont validées par SpF (Christine Campese). Le bilan d'activité du CNR concernant la surveillance des cas de légionellose s'appuie sur ces données.

SpF fournit toutes les informations utiles au CNR lors des investigations épidémiologiques. En retour, le CNR fournit le courrier des résultats des investigations sur l'interface de partage. Cette information est également transmise par le CNR à l'ARS qui a demandé l'analyse.

Ajoutés à ces contacts fréquents, SpF et le CNR ont mis en place une réunion annuelle dont l'objectif est de discuter des modifications organisationnelles et des études conjointes en cours et à programmer pour les années à venir. Deux réunions ont eu lieu en 2018 (visite à Lyon de C. Campese et D. Levy Bruhl) et 2019 réunion SpF-CNR-L et DGS (EA4

et CORRUSS) (Alban Robin, Yannick Pavageau, Caroline Le Borgne, Moïna S.Drouode ; SpF Daniel Levy-Bruhl, Christine Campese ; Ces réunions n'ont pas été reconduites en 2020 et 2021 dans le contexte pandémique

En 2021, dans le cadre de l'investigation de cas, plus de 1000 courriers personnalisés ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à SpF.

De 2017 à 2021, dans le cadre du diagnostic des cas de légionellose et de l'investigation de cas, **plus de 3800 courriers personnalisés** ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à SpF.

3.4.1.2 Nombre et caractéristiques des cas diagnostiqués en France (données SpF)

En 2021, 2 060 cas de légionellose ont été notifiés en France par le système de déclaration obligatoire. Parmi eux, 24 cas étaient des résidents des DROM (17 cas à la Réunion, 2 en Guyane, 2 en Guadeloupe et 2 en Martinique, 1 à Mayotte) et 16 cas étaient des ressortissants étrangers diagnostiqués en France. Le taux de notification des cas de légionellose en France était de 3,0/100 000 habitants (France métropolitaine 3,1/100 000 habitants).

Le nombre de cas de légionellose notifiés en 2021 était très nettement supérieur à celui de 2020 (1 328 cas soit +55% correspondant à un taux de notification de 2,0/100 000 habitants). Ces indicateurs étaient supérieurs à ceux de 2019 (1816 cas, 2,7/100 000 habitants) mais restaient inférieurs à ceux de 2018 (2133 cas, 3,2/ 100 000 habitants) (Figure 19).

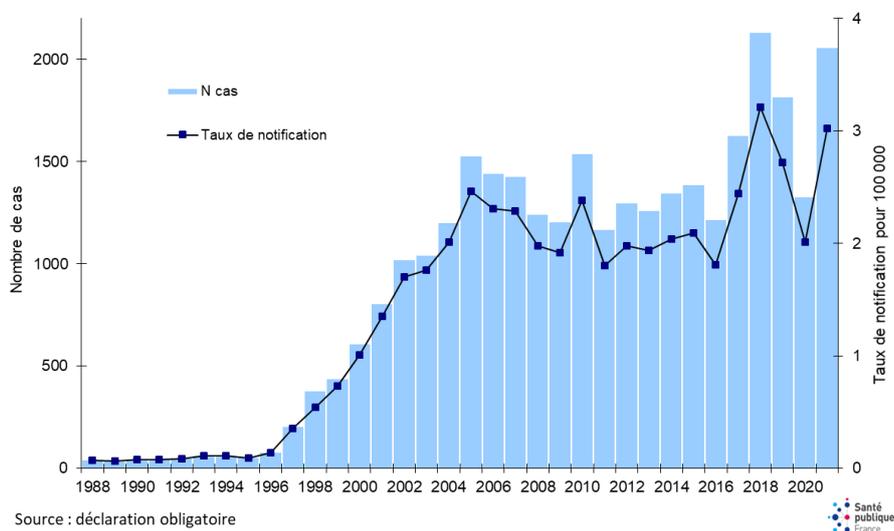


Figure 19 Evolution du nombre de cas de légionellose sur une année, 1988-2021 (données SpF).

En métropole, le gradient géographique Ouest-Est du taux de notification des cas de légionellose reste toujours très marqué, variant de 1,2 /100 000 habitants en Bretagne à 5,3/100 000 habitants en Auvergne-Rhône-Alpes (Figure 20). En comparaison avec ceux de 2018, les taux de notification en 2021 étaient supérieurs dans 7 régions notamment dans les 3 régions où ce taux dépasse 3,8 /100 000 habitants (Grand Est, Auvergne-Rhône-Alpes et Provence-Alpes-Côte d'Azur). Le taux de notification était en augmentation dans les Drom en comparaison de 2020 et à La Réunion ce taux a dépassé celui de 2018 (2,3/ 100 000 habitants en 2021 vs 2,1 en 2018).

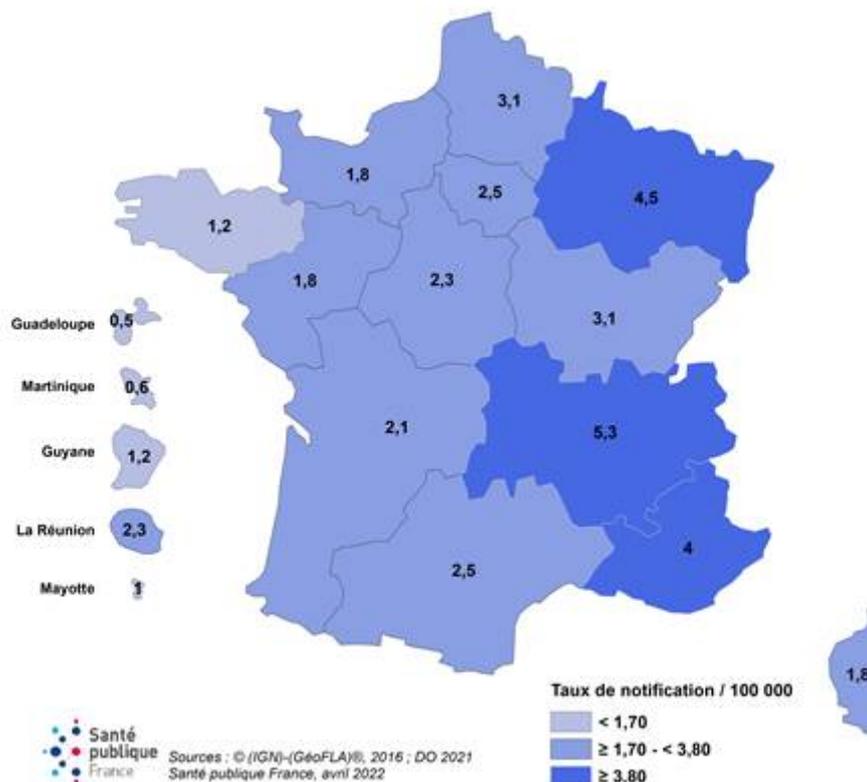


Figure 20. Distribution du taux de notification standardisé* des cas de légionellose selon la région de domicile en France, 2021

*standardisé sur le sexe et l'âge

Au total, sur la période 2017-2021, nous observons un nombre moyen de 1800 cas par an, supérieur au nombre moyen de 1300 cas observés sur la période 2012-2016. Ce nombre est probablement par ailleurs minoré pour l'année 2020 durant laquelle un nombre inférieur de cas a été observé du fait de l'épidémie de Covid-19.

Un autre point marquant comme l'illustre la figure 21 est l'existence de **pics de légionellose en juin 2018 et juillet 2021** représentant chacun **24,9%** (532/2133) **et 20,6%** (424/2060) **des cas de légionellose de l'année.**

Pour 2021, le nombre de cas mensuel s'est situé légèrement au-dessus de la moyenne mensuelle des cas notifiés de 2010 à 2020 excepté durant la période estivale. En effet, une forte augmentation du nombre de cas a été observée en juillet (+202% par rapport à la moyenne 2010-2020) et dans une moindre mesure en août (+41%) ; en septembre cette augmentation ne représentait que 29% (Figure 21).

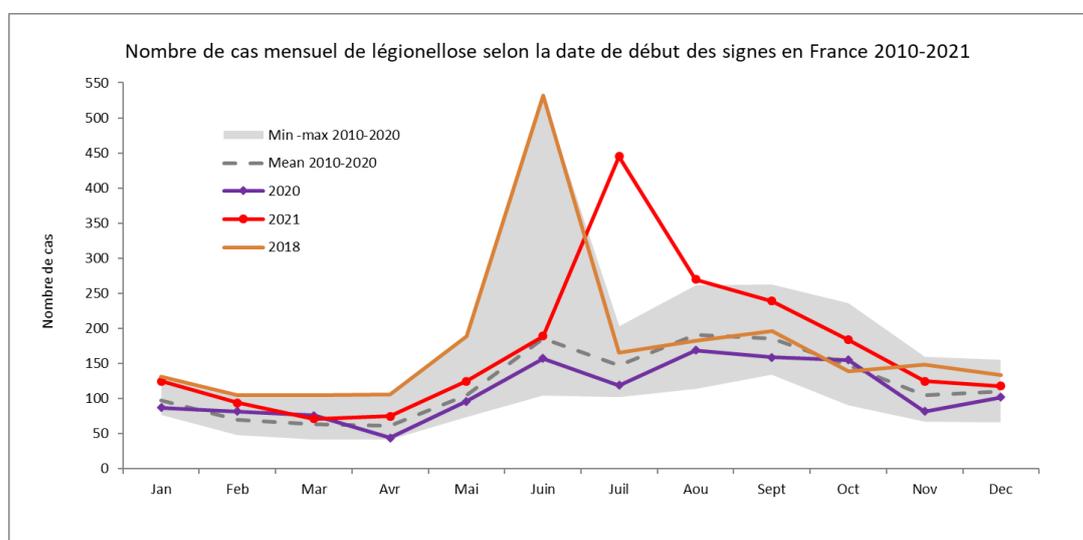


Figure 21. Nombre de cas mensuels notifiés de légionellose en France selon la date de début des signes, 2010-2021.

L'hypothèse retenue pour expliquer ces pics est l'**influence des facteurs météorologiques** sur la survenue des cas de légionellose, notamment la température, les précipitations et l'humidité qui semblent être des facteurs clés dans la survie et la dispersion des légionelles dans l'environnement. En 2021, le cumul des précipitations de juin et juillet moyenné sur la France a été au troisième rang des plus élevés depuis 1959.

Ces pics de diagnostics nous conduisent à investiguer de potentiels cas groupés et nécessitent une réactivité technique importante de la part du CNR. En 2018, le nombre important de souches à analyser et à comparer en lien avec le pic de juin nous a conduits à modifier notre flux de travail en positionnant la technique WGS en 1^{ère} intention pour le typage des souches ; dans ce contexte, un financement exceptionnel ponctuel nous a été accordé par SpF.

3.4.1.3 Surveillance des légionelloses atypiques

La très grande majorité des infections par *Legionella* sont des infections pulmonaires aiguës, également appelées maladies des légionnaires (*Legionnaires' disease*, LD). Les autres formes cliniques telles que les infections extra-pulmonaires et des syndromes pseudo-grippaux (fièvres de Pontiac) sont rarement décrites.

a- Légionellose pulmonaire ou Maladie des légionnaires

* **persistance de l'infection, récurrence ou réinfection**

Depuis quelques années, plusieurs cas de récurrence ou persistance de légionellose (sur plus de 2 mois avec des *Legionella* encore isolées de prélèvements pulmonaires) ont été signalés au CNR. Nous avons réalisé une description précise des caractéristiques cliniques et des facteurs associés aux patients en récurrences ou en échecs thérapeutiques de légionellose. Ces descriptions ont fait l'objet d'une publication dans la revue Clin. Infect. Dis. 2020 : **Slowly resolving or non-resolving Legionnaires' disease: case series and literature review**. Cécile Poudroux, [Christophe Ginevra](#), [Ghislaine Descours](#), [Anne-Gaëlle Ranc](#), [Laetitia Beraud](#), Sandrine Boisset, Anne Conrad, Anne Bergeron-Lafaurie, Nicolas Magand, [Sophie Jarraud](#), [Florence Ader](#).

Impact : Douze cas de légionellose communautaire d'évolution lente ou non résolue sur 1686 cas avec culture positive (2013-2017) ont été décrits, définis comme ayant des symptômes cliniques persistants, des anomalies au CT-Scan et une détection de *Legionella* dans des échantillons respiratoires par culture et/ou par PCR >30 jours après l'apparition des symptômes. Sur le plan clinique, 9 patients se sont rétablis temporairement avant une nouvelle détérioration (intervalle médian [IQR] sans symptômes, 30 [18-55] jours), 3 patients ont eu des symptômes uniformément persistants (temps médian [IQR], 48 [41,5-54] jours). Deux patients ont eu plus de deux récurrences. Ces persistances ou récurrences apparaissent chez des patients immunodéprimés, pouvant être associée à un abcès pulmonaire et un empyème. Cette description est cohérente avec les recommandations de traitement par bi-thérapie des patients immunodéprimés pendant 21 jours. Au cours des investigations, les isolats disponibles ont été séquencés en longitudinal, la résistance aux antibiotiques recherchée par des méthodes phénotypiques et/ou moléculaires (PCR-NGS) pour les échantillons en absence de souches ; aucune résistance ni évolution génomique n'a été détectée. L'incidence est probablement sous-estimée car elle ne prend en compte que les légionelloses pour lesquelles la (les) culture(s) étai(en)t positive(s). Un autre article plus récent de l'équipe Danoise décrit également ces légionelloses récurrentes ou des réinfections et indiquent également leur probable sous estimation.

* **Description de co-infection *Legionella* – SARS-Cov-2**

En Mars- Avril 2020 le CNR et Santé publique France ont eu connaissance de plusieurs cas de co-infections de *Legionella* et SARS-Cov-2. Dans l'objectif de caractériser l'incidence de ces co-infections nous avons réalisé une étude rétrospective sur les cas de légionellose notifiés avec une date de début des signes en Mars 2020 et leur statut sur une infection à SARS-Cov-2. Cette étude intéressante montre une incidence entre 10 et 14% de co-infections parmi les cas de légionellose notifiés en Mars 2020. Parmi les sept cas de co-infection bien caractérisés (Cf Chapitre 3.4.1), il n'est pas clair s'il s'agit de co-occurrence ou de surinfection de *Legionella* sur une infection primitive virale. Pour 5 patients la détection de *Legionella* et de SARS-CoV-2 a été concomitante sur des prélèvements du même jour. Pour deux patients, le diagnostic de légionellose était pour l'un antérieur et pour l'autre postérieur (infection potentiellement nosocomiale) à la détection du SARS-Cov-2. Les patients co-infectés étaient plus âgés, avec plus de co-morbidités. Ils ont plus fréquemment nécessité une admission en réanimation et avaient une mortalité plus élevée que les cas de Légionellose seule.

Cette étude a été publiée dans *Emerging Infectious Disease* en 2021 et présentée à différents congrès (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Conference on Coronavirus Disease (ECCVID) sept 2020, online congress et soumission à *Emerging Infectious Disease*).

Co-infection of *Legionella* and SARS-CoV-2 in France, March 2020. Camille Allam, Alexandre Gaymard, Ghislaine Descours, Christophe Ginevra, Laurence Josset, Maud Bouscambert, Laetitia Beraud, Marine Ibranosyan, Camille Golfier, Arnaud Friggeri, COVID-19 diag HCL consortium, Bruno Lina, Christine Campese, Florence Ader, Sophie Jarraud

***Participation à la description des cas de légionellose chez les transplantés d'organes solides**

Le CNR a été sollicité pour participer à la description des cas de légionellose chez les transplantés d'organes solides (étude LEGIOTOS). Une première étude rétrospective observationnelle monocentrique a été réalisée pour les cas de l'Hôpital européen Georges Pompidou (HEGP, Paris) entre 2000 et 2018. Une étude nationale rétrospective multicentrique s'est poursuivie en 2020 par G. Thizy, E. Lafont et D. Lebeaux de l'HEGP en collaboration avec le Pr F. Lanternier et le CNR et fera l'objet d'une prochaine publication. Cette étude avait pour objectif de décrire les manifestations cliniques, le traitement et l'évolution des légionelloses chez les patients transplantés d'organes solides pour les cas documentés en France de 2009 à 2019. Cent et un patients ont été inclus à partir de 38 centres de transplantation ; la majorité (70,3%) étaient des transplantés rénaux. Le délai médian entre la transplantation et la légionellose était de 5,6 ans [intervalle interquartile (IQR), 2 jours-42 ans]. La légionellose est rare après une transplantation d'organe solide. Le diagnostic peut être difficile en raison de la présentation atypique. La présence de nodules pulmonaires a été observé dans plus de 10% des cas. La mortalité était similaire à celle de la population générale. L'antigène urinaire était le test de diagnostic de première ligne dans cette population étudiée. L'utilisation plus systématique de la PCR devrait favoriser le diagnostic des légionelloses à *L. non pneumophila* dans cette population immunodéprimée.

b- Légionelloses extra-pulmonaires

Les infections atypiques dues à *Legionella*, notamment extra-pulmonaires, sont surveillées par le CNR. Ces formes sont exceptionnelles mais une veille est importante pour repositionner la place de *Legionella* dans de telles infections.

*** Fasciites nécrosantes**

En 2019, nous avons décrit l'implication de *L. pneumophila* séro groupe 8 dans une fasciite nécrosante fatale localisée sur la thrombose veineuse profonde (TVP) d'un cathéter d'hémodialyse chez un patient immunodéprimé (présentation orale au congrès SFM en 2019 et poster à ESGLI 2019 à Athènes). En 2020, un autre cas de fasciite nécrosante fatale a été rapporté par le CHRU de Nancy pour lequel il a été isolé une souche de *L. pneumophila* séro groupe 1 ST6 d'un prélèvement de tissu mou chez un patient immunodéprimé présentant des œdèmes diffus. Deux hypothèses physiopathologiques pouvaient être envisagées pour ces deux cas : une inoculation de *Legionella* par le cathéter pour le cas n°1 ou au niveau des lésions cutanées induites par les œdèmes pour le cas n°2 suivie d'une dissémination hématogène et d'une pneumopathie secondaire, ou plus probablement, une pneumonie à *Legionella* non diagnostiquée à l'admission suivie d'une dissémination hématogène et d'une localisation et multiplication au niveau du site lésé. La réalisation au CNR des Légionelles du séquençage 16S MinION (Oxford Nanopore Technologies) sur les prélèvements de tissus mous a permis de confirmer le rôle exclusif de *Legionella* dans ces 2 cas de fasciite nécrosante. Un article décrivant ces deux cas est en cours de rédaction, seuls 2 cas de fasciite nécrosante à *Legionella* ayant été décrits dans la littérature.

*** Arthrites**

En 2019, nous avons rapporté un cas de monoarthrite à *L. bozemanii* survenue chez une patiente immunodéprimée suite à une chute sur le goudron mouillé et à une injection intra-articulaire de corticoïdes. Nous avons associé la description de ce cas à une revue exhaustive de la littérature (n=9 cas) qui a révélé que la présentation clinique des arthrites à *Legionella* révèle le mode de contamination et l'espèce bactérienne impliquée : alors que les monoarthrites surviennent majoritairement après inoculation chez des patients sous traitement immunosuppresseur et sont associées à des souches non-*Legionella pneumophila* séro groupe 1 qui prédominent dans l'environnement, les polyarthrites sont plus probablement des localisations secondaires de légionellose pulmonaire après dissémination sanguine de *Legionella pneumophila* séro groupe 1, espèce la plus fréquemment retrouvée dans les pneumonies (Ibranosyan M, Beraud L, Lemaire H, Ranc AG, Ginevra C, Jarraud S, Descours G. The clinical presentation of *Legionella* arthritis reveals the mode of infection and the bacterial species: case report and literature review. BMC Infect Dis. 2019 Oct 21;19(1):864).

*** Endocardites infectieuses (EI)**

Les endocardites infectieuses à *Legionella* sont rares. Un total de dix-huit cas d'EI causées par des espèces de *Legionella* sont décrits dans la littérature, et dans seulement deux d'entre eux, la valve affectée était native. La présentation des endocardites à *Legionella* tend à être subaiguë, avec une perte de poids, une fièvre de bas grade et une anémie, et sans manifestations périphériques. Deux exceptions ont été notées, une présence de *Legionella* dans le système nerveux

central et un cas de microembolies digitales. La majorité des patients atteints d'EI n'ont pas d'infection des voies respiratoires précédant ou concomitant, et seuls quatre des dix-huit cas ont présenté des résultats cliniques ou radiologiques compatibles avec une pneumonie. Une autre caractéristique des EI à *Legionella* rapportées est que, bien que de petites végétations valvulaires soient souvent visibles lors de la chirurgie, elles sont fréquemment indétectables par échocardiogramme. Par conséquent, comme les patients ne présentent souvent que des signes modérés d'inflammation, le diagnostic d'EI peut être retardé. Devant le peu de symptôme évocateur, nous suggérons d'envisager l'utilisation plus systématique de la PCR *Legionella* sur sérum en cas d'endocardite notamment sur valve prothétique de culture négative. Voici quelques cas pour lesquels le CNR a participé au diagnostic entre 2017 et 2021 :

- EI à *L. bozemanii* chez un patient immunocompétent

Nos collègues d'Oslo, Norvège, ont fait appel à nous pour la réalisation d'une sérologie ciblant *Legionella bozemanii* dans le cadre d'une endocardite infectieuse. Cette collaboration a permis de rapporter un cas d'endocardite infectieuse à *Legionella bozemanii* chez un homme immunocompétent de 66 ans ayant subi une homogreffe aortique. Le diagnostic a été posé par amplification directe de l'ARNr 16S à partir du matériel valvulaire, confirmé par une *Legionella*-PCR ciblée positive dans le sérum et la détection d'anticorps spécifiques de *Legionella bozemanii*. Le patient a été traité avec succès par lévofloxacine et azithromycine pendant six semaines.

- Suspicion d'EI à Lp5 à Nice

En 2021, un diagnostic d'endocardite infectieuse sur tube pulmonaire a été évoqué chez un patient du CHU de Nice aux antécédants cardiaques complexes, devant une échocardiographie du tube pulmonaire suspecte et un titre fort d'anticorps dirigés contre le sérogroupe 5 (>1000). La PCR sur serum était négative. Le patient a reçu un traitement d'épreuve par lévofloxacine et azithromycine pendant 3 mois suivi d'un relais oral.

- EI à Lp3 avec tableau neurologique à Lyon

En 2021, nous avons eu un cas d'une patiente du CHU de Lyon se présentant pour un AVC fébrile avec un tableau de pneumopathie. La culture sur prélèvement pulmonaire était positive à Lp sérogroupe 3 et la PCR était positive dans le serum. Deux végétations ont été visualisées en ETO. La patiente a été traitée pendant 6 semaines par Rovamycine et Rifampicine.

* **Abcès cérébral à *Legionella pneumophila* sérogroupe 1**

Un cas d'abcès cérébral à Lp1 nous a été rapporté par le laboratoire de l'IHU de l'hôpital de la Timone à Marseille et par l'ARS PACA en 2021 chez une patiente ayant eu un geste chirurgical pour une mise en place d'électrodes de neurostimulation. L'hypothèse était une surinfection du site opératoire. Des signes neurologiques (hémi-parésie, maux de tête) ont fait découvrir un abcès cérébral massif. Une PCR 16s réalisée au CHU de Marseille a permis d'identifier l'espèce *L. pneumophila* et la culture est revenue positive à Lp1. L'enquête environnementale réalisée par le CNR en collaboration avec les services hospitaliers de Marseille et l'ARS a permis d'identifier l'eau du domicile de la patiente comme étant la source probable de contamination.

c- Fièvres de Pontiac

La fièvre de Pontiac est caractérisée par un syndrome pseudogrippal résolutif spontanément, sans pneumonie, avec un taux d'attaque de plus de 90%. La physiopathologie de cette forme clinique reste mal comprise. Le diagnostic est exceptionnellement réalisé mais peut se faire par détection des antigènes urinaires s'il s'agit de cas à Lp1 ou par sérologie. En l'absence de pneumonie, peu ou pas de souches responsables de fièvre de Pontiac sont disponibles, empêchant d'identifier de potentielle spécificité des souches de *Legionella* à induire de telles épidémies. Il apparaît parfois au cours des épidémies de fièvre de Pontiac quelques cas avec des symptomatologies pulmonaires légères.

Au cours de la mandature précédente, 2 épidémies de fièvre de Pontiac ont été investiguées.

La première suspicion d'une épidémie de fièvre de Pontiac était liée à **une exposition environnementale de plus d'une centaine de salariés d'une usine (Clareboud Potatoes) à Neuve Eglise (Belgique) située à proximité de la frontière franco-belge en juillet 2017.**

L'alerte a été donnée par le service des urgences du CH d'Armentières qui signalait à l'ARS Hauts-de-France l'admission de 7 personnes présentant un syndrome pseudo-grippal avec altération de l'état général, asthénie, hyperthermie jusqu'à 41°C, douleurs abdominales voire vomissements. Un total de 127 cas de syndromes pseudo-grippaux (76 Français, 51 belges) a été rapporté. Ces personnes avaient toutes pour point commun de travailler dans la section réception, tri, nettoyage des pommes de terre au sein de cette entreprise qui emploie près de 90% de français, et d'avoir été exposées à des aérosols 24-48 h avant l'apparition de la symptomatologie. Le CNR a investigué cette épidémie en analysant les

prélèvements de 73 des 76 patients français : 7 prélèvements broncho-pulmonaires (dont un positif par culture à *Legionella bozemanii*) et 123 sérums (analysés par technique d'immunofluorescence « maison », dont 18 montrant un titre ≥ 128 pour les espèces *L. bozemanii*, *L. anisa*, *L. micdadei*, *L. dumofii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. longbeachae*). Un échantillonnage de 32 sérums issus de 16 patients belges a également été analysé. Les investigations environnementales ont été conduites par les autorités belges mais n'ont pas permis de conclure formellement sur cette origine de contamination fortement suspectée.

Il s'agit ici de la **première épidémie décrite de fièvre de Pontiac en France**.

En août 2019, le CNR a enquêté sur des **cas groupés de fièvre de Pontiac et de légionellose au sein de deux familles hollandaises ayant fréquenté le même jacuzzi**. La première famille (2 parents et 3 enfants) séjournait en vacances dans un mobile home d'un camping de l'Hérault. Les PCR *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 réalisées sur les prélèvements ont été positives pour les 4 patients symptomatiques et un typage moléculaire réalisé directement sur les prélèvements par Nested-Sequence-Based Typing (N-SBT) a permis d'obtenir une amplification pour 5 gènes sur 7, uniquement pour l'un des patients. Aucune souche n'a pu être isolée. Dans les suites, les autorités sanitaires des Pays-Bas ont signalé à Santé publique France 4 cas de fièvre de Pontiac parmi les membres d'une autre famille hollandaise (antigènes solubles urinaires positifs, sans notion de pneumopathie associée) ayant utilisé le même jacuzzi.

Dans le cadre de la surveillance des cas liés aux voyages, des notifications au réseau ELDSNet ont été réalisées, correspondant ainsi à une situation de « *rapid evolving cluster* » tel que défini par le réseau ELDSNet. Les médecins de secteur ont été sensibilisés par l'ARS Occitanie à la présence d'une suspicion de cas groupés de légionellose et à l'éventualité de l'apparition de cas, notamment pédiatriques, ce qui est assez rare.

L'enquête environnementale réalisée par le CNR à partir de souches isolées de ce jacuzzi a montré un ST compatible avec le profil identifié chez le patient, ce qui nous a amené à conclure que cette source de contamination était vraisemblable.

3.4.1.4 Expertise dans le typage des souches de légionelles

Les développements des méthodes de typage réalisés au cours de ces 5 dernières années sont décrits chapitre 2.4.2.

Au cours du mandat 2017-2021, **de nombreux changements de techniques ont été opérés au CNR**, la plupart en lien avec le **déploiement du NGS au CNR**.

* Concernant le typage des souches : déploiement du WGS

- En lien avec une problématique de disponibilité des Ac monoclonaux (mAbs) qui n'était plus assurée de façon continue par le CNR d'Allemagne (Dresden), nous avons progressivement abandonné la caractérisation du sous-groupe des souches de Lp1 par immuno-fluorescence ; l'alternative proposée est la caractérisation du gène *lag* par WGS, elle ne permet néanmoins pas de définir le sous-groupe précisément (parmi les 7 sous-groupes) mais représente une technique robuste pour définir si la souche possède ou non l'Ag mAb3/1.
- A partir de 2019, devant les contraintes techniques fortes pour la réalisation du PFGE, le CNR a remplacé le PFGE par l'AP-PCR, permettant notamment un criblage des souches environnementales à comparer avec la souche clinique en cas d'investigation. Puis, devant l'utilisation croissante des outils de NGS et la mise en place de la plateforme GenEPII sur le même site que le CNR, la technique d'AP-PCR a été abandonnée en 2020, toutes les souches cliniques et environnementales en lien avec un cas étant caractérisées par WGS à partir de 2021.
- Ce déploiement systématique du WGS nous permet également d'extraire les allèles du ST et du cg-MLST par un traitement bio-informatique. La technique de SBT avec séquençage Sanger double brin a ainsi été abandonnée progressivement. Elle est désormais limitée à la caractérisation des nouveaux ST (à la demande du *Public Health England*).

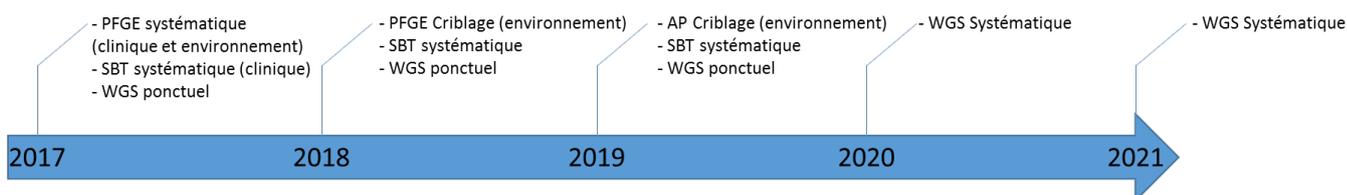


Figure 22. Evolution du Workflow de typage des isolats cliniques et environnementaux de *Legionella pneumophila* au CNR.



Figure 23. Evolution du nombre de WGS annuel effectués au CNR.

* Concernant le typage sur prélèvement par nested-SBT

Jusqu'en mai 2017, cette analyse était réalisée de manière systématique sur tout prélèvement négatif en culture. Mais face aux faibles performances de cette technique, il a été choisi de ne plus la réaliser que sur demande de l'ARS (dans le cadre d'une comparaison avec des souches environnementales isolées) et en cas de PCR Lp1 positive (technique maintenue en systématique sur les prélèvements négatifs en culture). En 2021, la PCR Lp1 a été remplacée dans l'algorithme de prise en charge des prélèvements par la PCR ESGLI biplex Lp/Lp1. Ainsi le typage directement sur prélèvement en cas de culture négative est réalisé en cas de d'enquête à la demande d'une ARS et en présence d'une PCR ESGLI Lp positive.

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

Résultats du typage des isolats cliniques

- **Sequence Type (ST).** Un ST est obtenu pour l'ensemble des souches de *L. pneumophila* d'origine clinique reçues au CNR. Ce ST est extrait de l'analyse des génomes entiers. En 2021, 551 isolats cliniques de Lp ont été analysés. L'ensemble des Lp analysées appartenait à 125 *Sequence Type* (ST) différents. Comme les années précédentes, plus de la moitié des souches appartiennent à 9 STs; l'évolution de ces ST au cours des 7 dernières années est représentée en Figure 24 et dans le tableau 9.

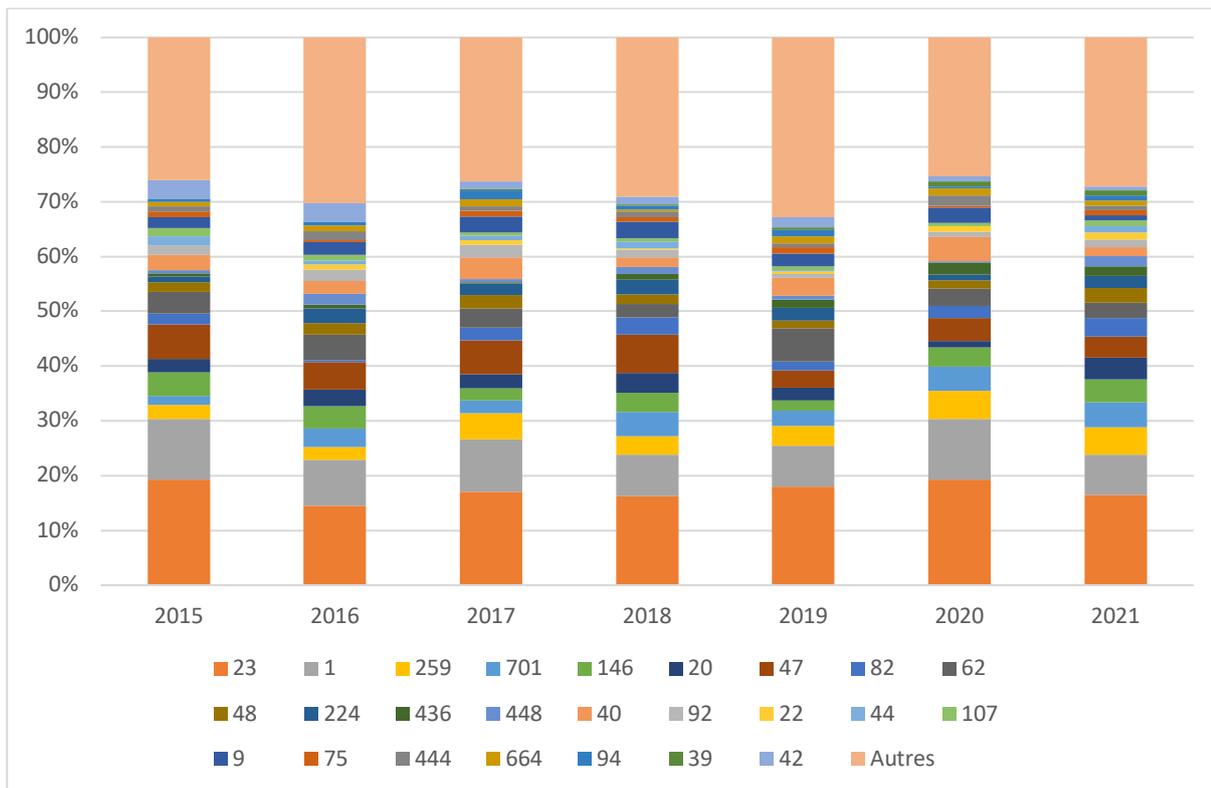


Figure 24. Proportion des ST de *Legionella pneumophila* entre 2015 et 2021

Tableau 9 Proportion des ST le *Legionella pneumophila* entre 2015 et 2021

ST	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	TOTAL
23	19%	14%	17%	16%	18%	19%	17%	17%
1	11%	8%	10%	8%	7%	11%	7%	9%
259	3%	2%	5%	3%	4%	5%	5%	4%
701	2%	3%	2%	4%	3%	4%	5%	3%
146	4%	4%	2%	4%	2%	3%	4%	3%
20	3%	3%	3%	4%	2%	1%	4%	3%
47	6%	5%	6%	7%	3%	4%	4%	5%
82	2%	0%	2%	3%	2%	2%	3%	2%
62	4%	5%	3%	3%	6%	3%	3%	4%
48	2%	2%	2%	2%	1%	2%	3%	2%
224	1%	3%	2%	3%	2%	1%	2%	2%
436	1%	1%	0%	1%	2%	2%	2%	1%
448	1%	2%	1%	1%	1%	0%	2%	1%
40	3%	2%	4%	2%	3%	4%	2%	3%
92	2%	2%	2%	1%	1%	1%	1%	1%
22	0%	1%	1%	0%	0%	1%	1%	1%
44	2%	1%	1%	1%	0%	0%	1%	1%
107	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%
9	2%	2%	3%	3%	2%	3%	1%	2%
75	1%	0%	1%	1%	1%	0%	1%	1%
444	1%	2%	1%	1%	1%	2%	1%	1%
664	1%	1%	1%	0%	1%	1%	1%	1%
94	1%	1%	2%	1%	1%	0%	1%	1%
39	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	0%
42	3%	3%	1%	1%	2%	1%	1%	2%
Autres	26%	30%	26%	29%	33%	25%	27%	28%
TOTAL	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

La répartition géographique de ces ST majoritaires n'est pas équivalente. Elle est représentée dans la figure 25

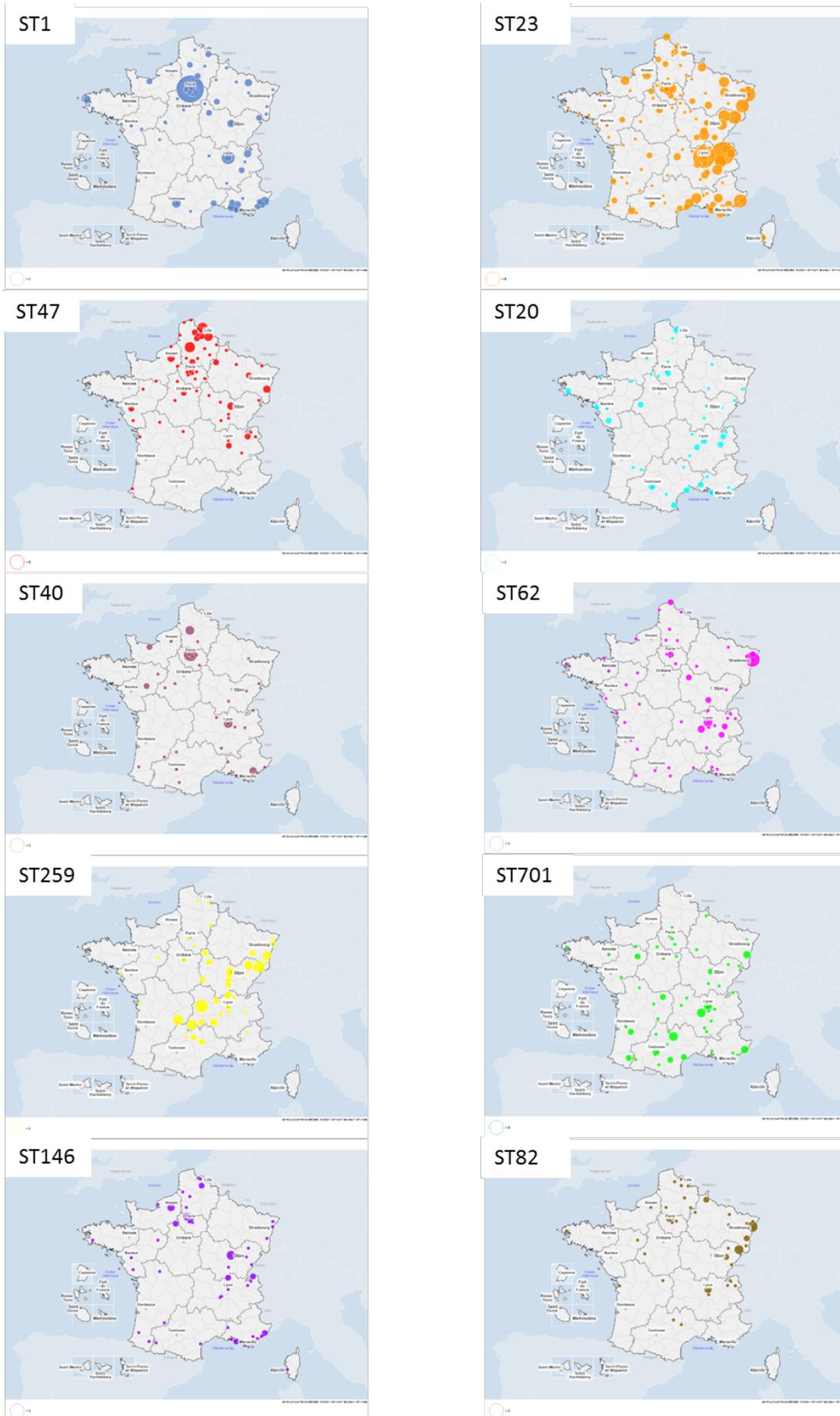


Figure 25. Répartition des 10 principaux ST de *Legionella pneumophila* isolées de prélèvement cliniques entre 2015 et 2021

- **cgMLST.** L'analyse par cgMLST permet de discriminer des isolats qui ne peuvent être discriminés sur la seule base du ST. Par exemple de sous typer les souches des ST les plus fréquemment isolés (ST1, 23, 47...) (Figure 26)

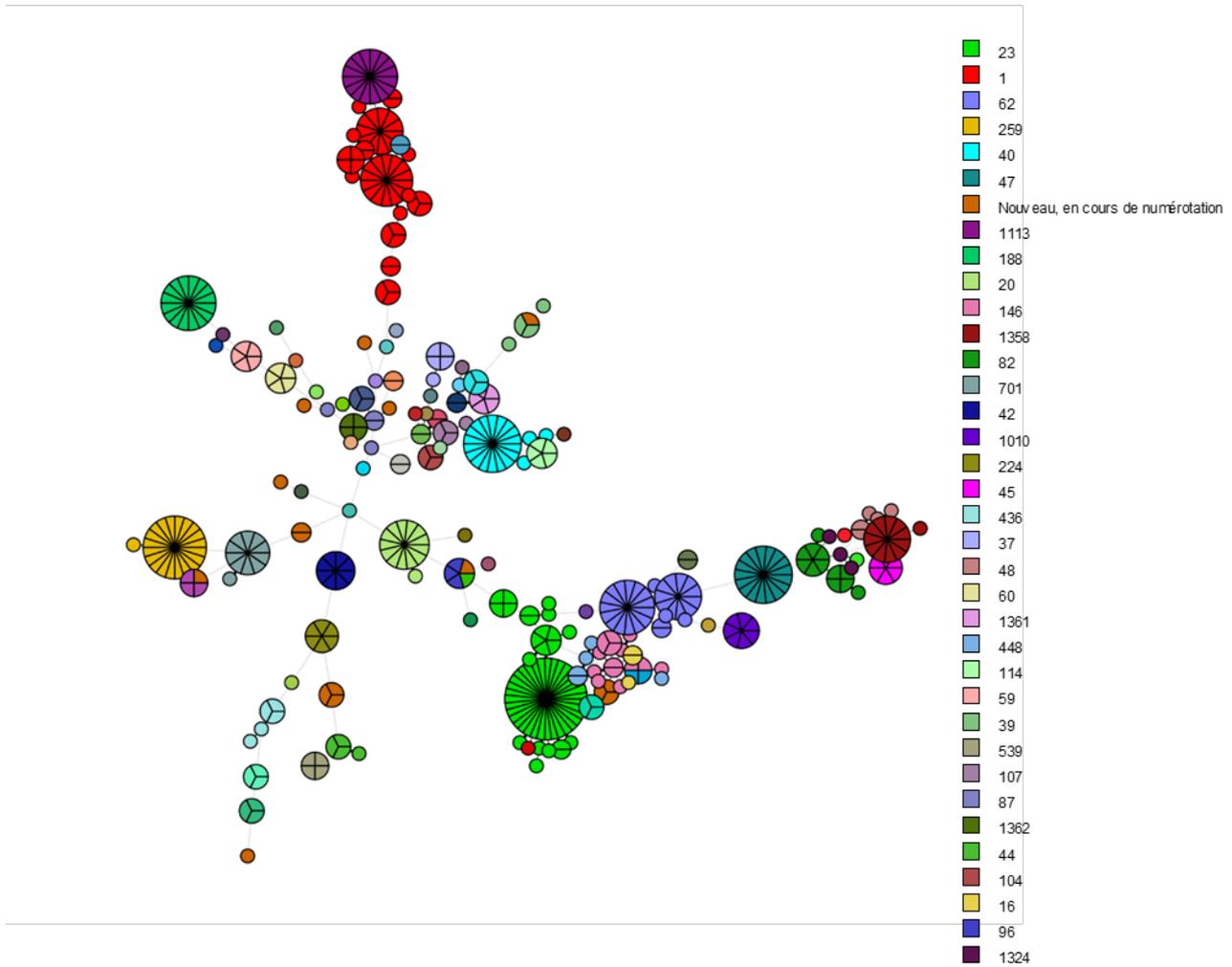


Figure 26. Minimum spanning tree basé sur les 50 gènes du cgMLST. Les couleurs représentent les ST basés sur les 7 gènes du SBT.

- Analyses phylogénétiques.** L'analyse phylogénétique des isolats permet une meilleure discrimination des souches très proches, non distinguable par le cgMLST. Elle permet aussi une analyse des populations de façon globale. Cette analyse nous permet de mettre en évidence les différentes sous espèce de *Lp* (figure 27). En 2021, parmi ces isolats de *L. pneumophila* (*Lp*), environ 88.9% appartiennent à la sous espèce *Lp* subspecies *pneumophila*, 9.9% à la sous espèce *Lp* subspecies *raphaeli*, 0.7% à la sous espèce *Lp* subspecies *fraseri* et 0.5% à une potentielle nouvelle sous espèce (sur la base de l'analyse phylogénétique et du pourcentage d'identité du génome) (Figure 28).

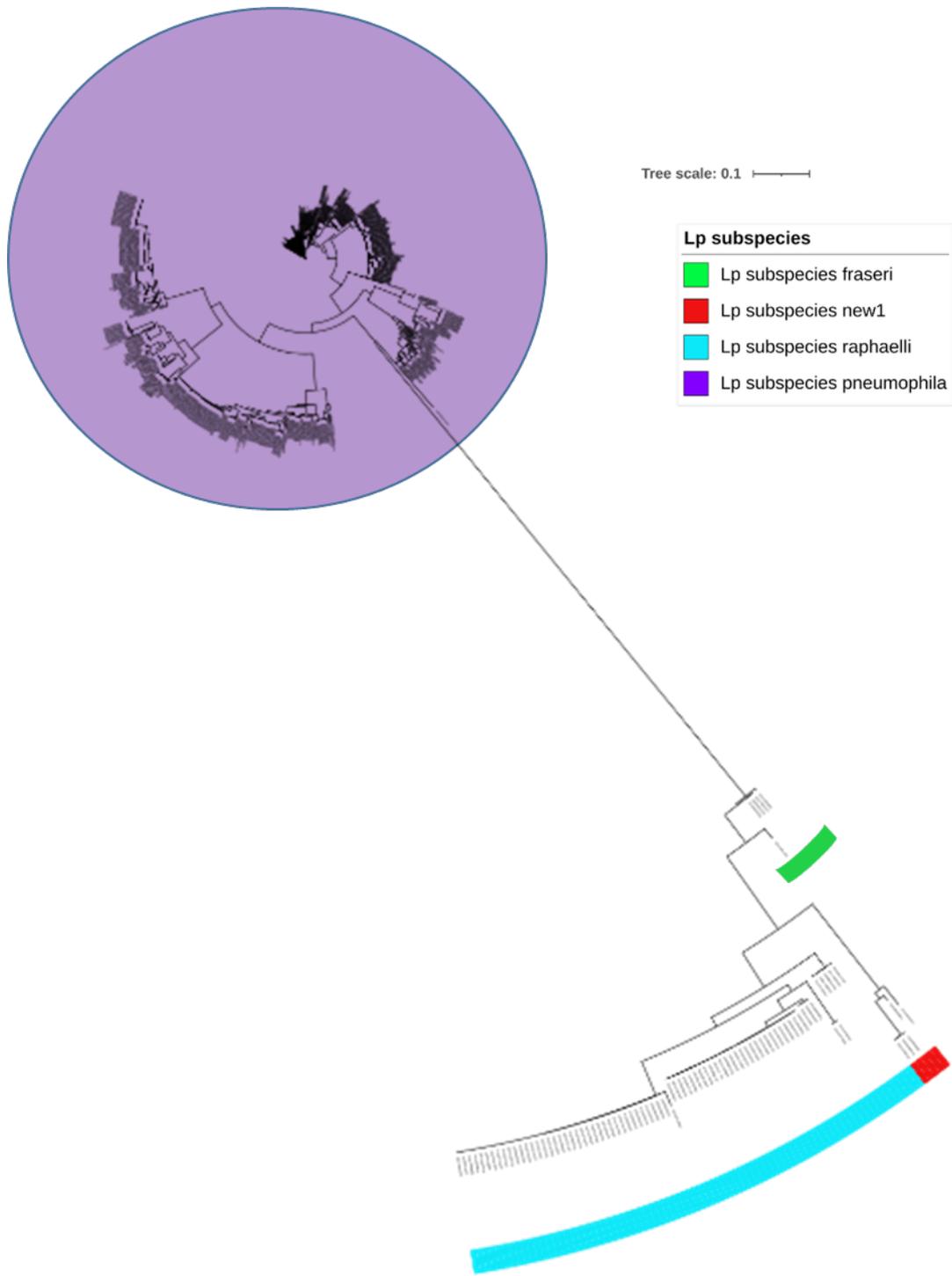


Figure 27. Arbre phylogénétique basé sur les SNPs du core genome des souches de Lp de 2020 et 2021.

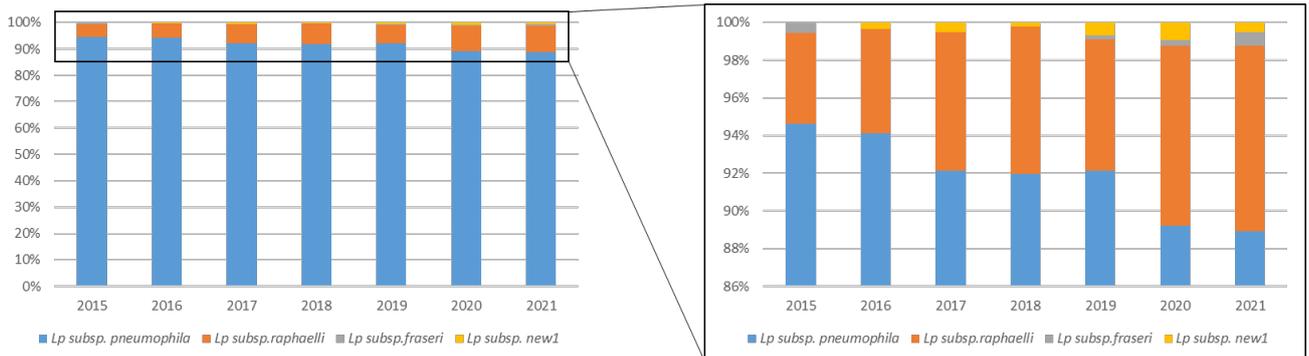


Figure 28. Proportion des différentes sous espèces de *Legionella pneumophila* entre 2015 et 2021.

Typage en cas de culture négative

En cas de culture et co-culture ambiante négatives, la technique de SBT nichée ou nested-SBT peut être réalisée directement sur le prélèvement. Cette technique présentant de faibles performances, elle n'est à présent réalisée que de façon ciblée, à la demande des ARS lors d'investigations épidémiologiques et uniquement sur les prélèvements montrant une PCR spécifique Lp positive. En 2021, 42 prélèvements ont été analysés par cette technique. Un ST complet a été obtenu directement sur prélèvement respiratoire pour 3 cas (1 cas en 2020). Pour 5 cas, 6 gènes sur les 7 gènes analysés ont été amplifiés et séquencés. Pour 28 cas, au moins 1 gène sur les 7 gènes analysés a été amplifié et séquencé.

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

En 2021, les données nationales de SpF rapportent que la part des expositions regroupant une notion de voyage représente 12% des cas et est comparable à celle de 2020 (13%). Toutefois, cette proportion est nettement inférieure à celle habituellement retrouvée ces dernières années (2010-2019 : 19%, $p < 10^{-6}$) et reflète probablement le contexte COVID-19.

Tableau 10. Expositions à risque parmi les cas de légionellose survenus en France, 2019-2021 (données SpF).

Expositions	2019 (N=1 816)		2020 (N=1 238)		2021 (N=2 060)	
	n	%*	n	%*	n	%*
Hôpital	106	6	84	6	121	6
Etablissement de personnes âgées	92	5	48	4	73	4
Station thermale	22	1	10	<1	13	<1
Voyage	334	18	179	13	242	12
Hôtel-camping	179	10	95	7	140	7
Résidence temporaire ^a	99	6	63	4	40	2
Autres types de voyage ^b	56	3	21	2	62	3
Autres ^c	152	9	117	9	266	13
Total des cas ayant au moins une exposition	706	39	438	33	715	35

* Rapportés au nombre total de cas (N)

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

^b Sans précision de lieu et type de logement

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

Source : déclaration obligatoire

Nous rapportons ici les investigations microbiologiques menées sur les cas de 2017 à 2021 ainsi que les résultats des investigations réalisées en 2021.

De 2017 à 2021, parmi les 8967 cas de légionellose déclarés, 277 (3,1 %) ont fait l'objet d'une investigation microbiologique avec comparaison entre la souche clinique isolée d'un prélèvement respiratoire et une ou plusieurs souches environnementales, ce qui correspondait à **12,6% (277/2190) des patients pour lesquels une souche avait été isolée.**

Un total de 277 enquêtes a été réalisé, parmi lesquelles **78,3% (217) ont permis d'identifier la source contamination (Tableau 11)**. Cette valeur est supérieure aux données de la période 2008-2014 pour laquelle seules 54% des investigations étaient positives. **Les données de 2021 sont relativement similaires à celles de la période 2017-2021 :**

parmi les 2060 cas de légionelloses déclarés, 64 (3,1%) ont fait l'objet d'une investigation, ce qui correspond à 11,3% des patients (64/564) pour lesquels une souche est isolée, et 75% (48/64) des enquêtes ont permis d'identifier la source de contamination. La distribution des investigations reste relativement similaire parmi les 64 investigations réalisées.

Tableau 11. Investigations épidémiologiques réalisées entre 2017 et 2021.

Origine souche environnementale	Investigations positives		Investigations totales	
	N	%	N	%
Hôpitaux	43	87%	49	18%
Domicile	72	83%	87	31%
Tourisme	38	84%	45	16%
Autres dont EHPAD	14	77%	21	25%
TAR	0	0%	27	10%
TOTAL	217	78%	277	100%

Le nombre d'investigations réalisées reste relativement stable sur la période 2017-2021, motivant des études pour renforcer l'investigation des cas, notamment au domicile des patients (Figure 29).

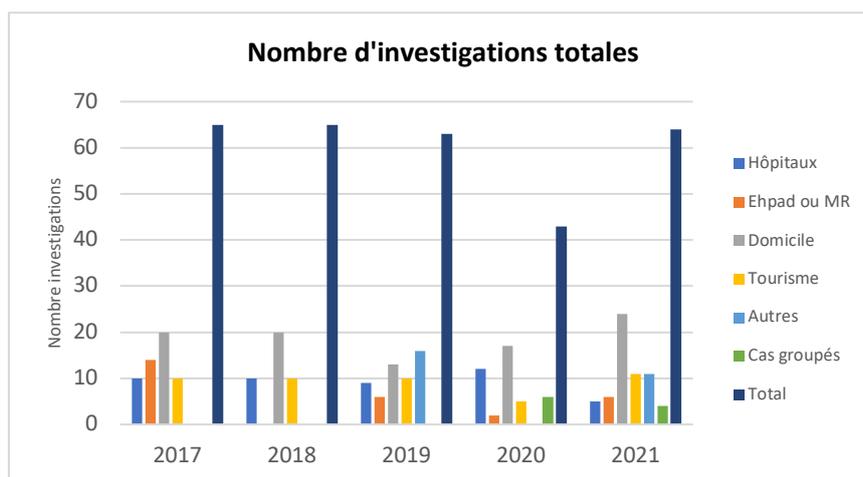


Figure 29. Evolution des investigations totales entre 2017 et 2021 en fonction de la provenance des souches environnementales

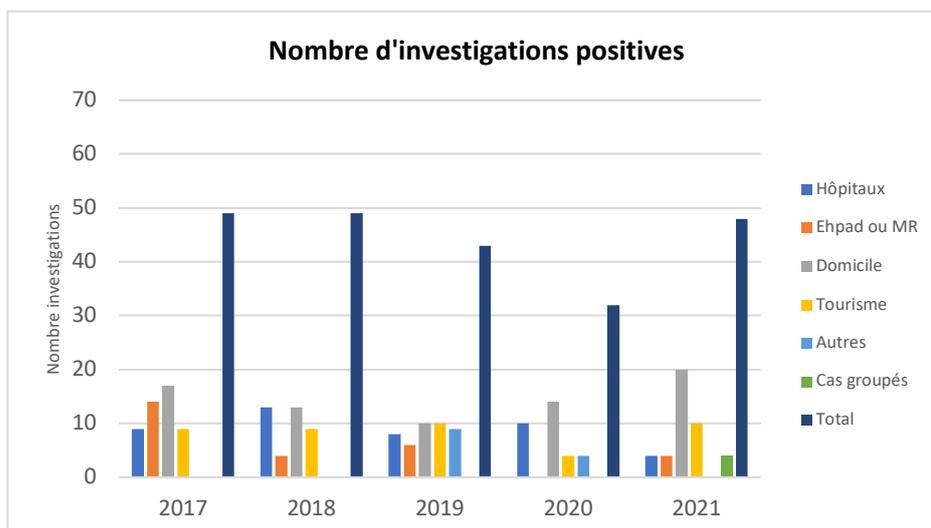


Figure 30 : Evolution des investigations positives entre 2017 et 2021 en fonction de la provenance des souches environnementales

3.4.2 Réseau de partenaires

3.4.2.1 Animation, évaluation, retour d'information

Le CNR travaille en collaboration étroite avec SpF et l'ensemble des ARS du territoire. De 2017 à 2021, toutes les demandes de comparaison reçues au CNR étaient validées par les ARS. Un système de double demande à partir de 2 fiches distinctes (une pour le laboratoire environnemental envoyant les souches et une pour l'ARS) permet de vérifier la justification de chaque demande.

Pour toute comparaison, un retour des résultats est envoyé à l'ARS concernée et à SpF. En contrepartie, les ARS nous informe et nous communique les conclusions des investigations et les rapports d'enquête pour els cas groupés.

La legionellose étant une maladie à déclaration obligatoire, l'ensemble des souches cultivées ou reçue au CNR sont déclarées à SpF qui croise ces données avec celles de la déclaration obligatoire. Ce système apporte la certitude que toutes les souches de Legionella isolée sur le territoire sont bien envoyées da manière exhaustive au CNR.

Nos partenaires sont outre les Agences Régionales de Santé (ARS), la Direction Générale de la Santé (DGS), les Cellules Inter-Régionales d'Epidémiologie (CIREs), les Directions Régionales de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL), les laboratoires de microbiologie de CHG et de CHU, les laboratoires d'analyses environnementales, les équipes d'hygiène opérationnelles (EHO) et les cliniciens.

3.4.2.2 Représentativité des données, souches ou prélèvements (origine géographique / type de laboratoires préleveurs : ville ou hôpital)

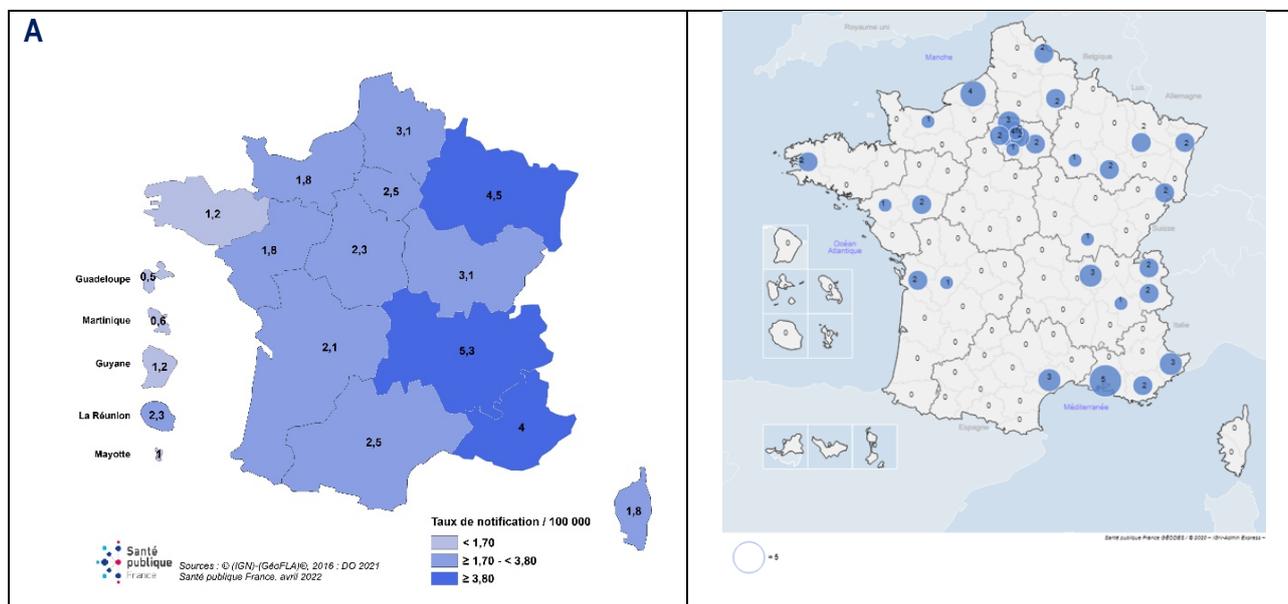


Figure 31. (A) Distribution du taux de notification standardisé des cas de légionellose selon la région de domicile en France, 2021 (données SpF) ; (B) Distribution du nombre d'investigations de cas de légionellose selon la région de domicile en France, 2021

Les souches nous proviennent quasi-exclusivement de CHU, CH ou laboratoires en lien avec une clinique, la majorité des cas de légionellose étant hospitalisés. La répartition des partenaires nous ayant adressé des souches cliniques a été présentée dans le paragraphe 3.2.1.1.

La distribution du nombre d'investigations de cas de légionellose selon la région de domicile en France réalisées en 2021 est présentée en figure 31. Si la plupart des comparaisons concerne les régions de l'Est de la France de façon représentative des cas, il est à noter un nombre important de comparaisons réalisées pour la région Ile-de-France.

3.4.3 Surveillance de la résistance de *Legionella* aux anti-infectieux

Le CNR dispose de plusieurs techniques permettant une surveillance systématique de l'apparition de résistance aux antibiotiques (cf 3.2.3.1). Sur la période 2017-2021, environ **500 antibiogrammes par microdilution ont été réalisés** sans mettre en évidence de CMI supérieures aux CMI d'une population sauvage. **Plus de 3000 génomes isolés depuis 2019 ont également été analysés par WGS associé à un pipeline « résistance ».**

En 2021, dans le cadre de l'enquête autour d'un cas de légionellose pour lequel aucune souche clinique n'avait été isolée mais pour lequel la technique de nested-SBT avait permis l'amplification de 4 gènes sur les 7 analysés, le CNR a été amené à réaliser un WGS de 8 souches environnementales de Lp1 isolées du réseau d'ECS d'un hotel fréquenté par le patient pendant la période d'incubation. L'analyse de ces souches par le pipeline « résistance » a mis en évidence la présence de mutations associées à un haut niveau de résistance aux macrolides dans tous les génomes analysés (le patient avait été traité par fluoroquinolones). Cette résistance a été confirmée phénotypiquement par un antibiogramme par microdilution. Cette découverte fortuite montre **l'apport du WGS dans la détection d'évènements rares tels que la résistance aux antibiotiques chez *Legionella*.**

Cette description fait l'objet de deux communications orales en 2022 (ESCMID et SF2H), ainsi que d'une publication acceptée dans JAC.

Détection de *Legionella pneumophila* résistantes aux macrolides dans un réseau d'ECS : rôle du WGS (résumé SF2H)
Ginevra C, Beraud L, Pionnier I, Sallabery K, Bentayeb H, Simon B, Allam C, Chastang J, Ibranosyan M, Decroix V, Campese C, Jarraud S, Descours G.

Introduction / Objectif. Une résistance aux antibiotiques peut facilement être sélectionnée *in vitro* chez *Legionella pneumophila* (Lp). Néanmoins, les souches résistantes ont rarement été décrites dans des contextes cliniques ou environnementaux, et la recherche de résistance par réalisation d'un antibiogramme (technique chronophage) est classiquement limitée aux patients présentant une légionellose d'évolution défavorable. Ici, nous décrivons comment une approche systématique par séquençage génomique (WGS) a permis d'identifier des souches Lp séro groupe 1 (Lp1) résistantes aux macrolides.

Matériel et Méthodes. Dans le cadre de ses missions de surveillance, le WGS des souches cliniques et environnementales est implémentée de façon systématique par technique Illumina® au CNR des Légionelles depuis 2019. Un pipeline bioinformatique additionnel recherche les mutations associées à une résistance aux antibiotiques utilisés dans le traitement des légionelloses sur *rpoB* pour la rifampicine, *gyrA*, *gyrB*, *parC* pour les fluoroquinolones, et *rplD*, *rplV* et *rrl* pour les macrolides. Les antibiogrammes sont réalisés par microdilution en milieu liquide.

Résultats. Un total de 3000 souches de Lp a été caractérisé par WGS depuis 2019. En août 2021, une mutation A2052G a été détectée par WGS sur les 3 copies du gène *rrl* codant l'ARN ribosomique 23S de 8 souches Lp1 environnementales. Ces souches provenaient d'ECS prélevées à différents points du réseau d'un hôtel fréquenté par un cas de légionellose. L'antibiogramme a confirmé un très haut niveau de résistance aux macrolides (CMI érythromycine et azithromycine \geq 1024 mg/L) sans résistance croisée à d'autres antibiotiques. Par chance, le patient avait été traité d'emblée par fluoroquinolones. Un traitement du réseau (choc thermique, changement de la pompe de recirculation) a permis une négativation de la culture de Legionella aux différents points du réseau. Néanmoins, 4 mois plus tard, le réseau était à nouveau colonisé.

Conclusion. La recherche systématique d'une résistance aux antibiotiques est désormais possible à partir des données de WGS. Elle a permis de décrire pour la 1ère fois en France des souches environnementales Lp1 résistantes aux macrolides. Des investigations sur le réseau d'eau concerné sont en cours.

3.4.4 Participation à des études concourant à la surveillance (2017 – 2021)

3.4.4.1 Etudes concourant à expliquer l'évolution du nombre de cas ces 5 dernières années

Les 5 dernières années ont été marquées par une augmentation importante du nombre de cas de légionellose en France en 2018 (+31%) et en 2021, et une diminution importante en 2020 (-30%). Nous avons investigué avec SpF ces périodes et émis des hypothèses.

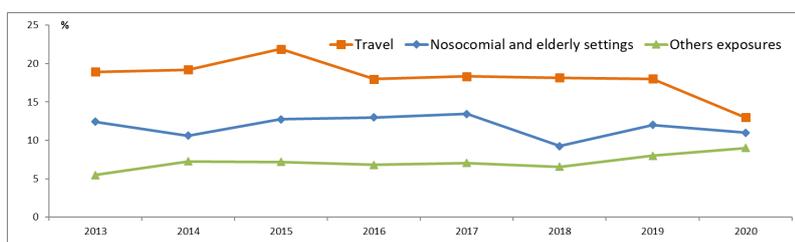
* La légionellose en France: importante augmentation du nombre de cas en 2018

Christine Campèse (christine.CAMPESE@santepubliquefrance.fr), Ghislaine Descours, Sibylle Bernard-Stoecklin, Laetitia Beraud, Catherine Maine, Anne-Gaelle Ranc, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud, BEH 2019

La tendance à l'augmentation du nombre de cas de légionellose amorcée en 2017 s'est poursuivie en 2018 (+31%) avec 2133 cas soit un taux de notification en France métropolitaine de 3,2 pour 100 000 habitants, qui est le record de cas observé depuis la découverte de la maladie. L'analyse des caractéristiques des cas survenus en 2018 montre des résultats comparables à ceux des années précédentes. L'augmentation en 2018 est principalement due à la recrudescence de cas sporadiques observés en juin qui représente 21% des cas, l'analyse par typage WGS n'a pas identifié de recrudescence des cas groupés. L'épisode a été concentré sur une période courte en mai-juin 2018 et seules certaines régions de France ont été particulièrement touchées. Il semble associé à une période marquée par des conditions météorologiques particulières (températures, humidité et précipitations) ; les patients atteints étaient souvent des hommes, plus jeunes avec plus de facteurs de risque, principalement le tabagisme. En parallèle et en dehors de cet épisode, une persistance du gradient ouest-est d'incidence des cas (taux d'incidence 5,1 fois plus élevé en Auvergne-Rhône-Alpes qu'en Bretagne) est observée en France.

* Forte diminution (de 27%) du nombre de cas notifiés en 2020 comparé à 2019 en lien avec le contexte COVID-19

L'année 2020 a été marquée par la pandémie de COVID-19 qui a provoqué une baisse notable (d'environ 30%) de l'activité globale du CNR. Celle-ci est probablement due aux périodes de confinement et de moindre déplacement des populations (13% de cas liés au voyage en 2020, versus 19% pour les années 2013-2019), qui a induit une baisse des cas de légionellose au niveau national.



	2013-2019	2020	p
	N = 10796	N= 1328	
Community acquired	6 727 (62%)	890 (67%)	p<0.001
Travel	2049 (19%)	179 (13%)	p<10-6

Expositions à Risque des cas de légionellose en France, 2013 – 2020 -données SpF

Cette baisse des cas n'a pas été reliée à un sous-dépistage des cas. Cette hypothèse a été vérifiée très rapidement au début de la pandémie. En effet durant la période d'étude sur les co-infections *Legionella* SARS-Cov-2 (Mars 2020), nous avons identifié une diminution de 18% du nombre de cas notifiés par rapports à 2019 (65 cas notifiés vs 79 en 2019). Afin de s'assurer qu'il ne s'agissait pas d'une diminution des demandes de diagnostic de légionellose nous avons contacté les 59 laboratoires hospitaliers (47 villes) ayant réalisé le diagnostic des 65 cas pour connaître le nombre d'antigénurie réalisé (test le plus fréquemment utilisé pour le diagnostic en France (96%) en 2019 et 2020. Une augmentation du nombre de tests réalisés a été observée, passant de 3 203 en mars 2019 à 8 004 en mars 2020 (multiplication par 2,5, IQR : [1,6-2,8]). En parallèle, les données obtenues auprès de 6 grands fournisseurs de tests urinaires ont confirmé une augmentation des tests vendus aux laboratoires français (multiplication par 2,1, IQR : [1,52 - 14,8]) sur ces deux périodes. L'augmentation de tests vendus sur l'ensemble de la France s'est confirmée sur la totalité de l'année 2020 (multiplication par 1.3). Ainsi, la baisse de l'incidence des cas de légionellose observée en 2020 ne semble pas due à une sous-prescription des tests de diagnostic de la légionellose.

3.4.4.2 Etude portant sur l'incidence de la contamination par *Legionella pneumophila* via l'utilisation d'appareil d'apnée du sommeil, ou de machine à pression continue entre 2011 et 2019.

Ce travail a fait l'objet d'un abstract accepté au congrès ECCMID 2020 et une publication est en cours de rédaction.

Legionnaires' disease and sleep apnea devices: retrospective analysis of a 9-year-investigation and contribution of Whole Genome Sequencing. [Camille Allam](#), [Christine Campese](#), [Christophe Ginevra](#), [Laetitia Beraud](#), [Aline Prugne](#), [Delphine Morel](#), [Ghislaine Descours](#), [Sophie Jarraud](#)

Contexte : La Légionellose est due à l'inhalation d'aérosols contaminés par la bactérie *L. pneumophila*. L'utilisation d'appareils d'apnée du sommeil (AAS) ou d'oxygénothérapie est en augmentation pour les patients souffrant de syndrome d'apnée du sommeil (SAOS). Ceux-ci peuvent représenter un risque de contamination en cas de mésusage. Cependant, l'incidence des cas de Légionellose suite à l'utilisation de ces dispositifs n'est pas bien connue.

Matériels et Méthodes : Nous avons recensé l'exposition à des AAS chez tous les patients ayant déclaré une Légionellose sur une période de 9 ans. Une recherche de Légionelle par culture et/ou qPCR a été réalisée sur les prélèvements d'eau issues des AAS envoyés au CNR pour comparaison. Les souches, ou ADN de *Legionella* ont été typées par Sequence Based Typing (SBT), *Whole Genome Sequencing* (WGS) ou nested-SBT.

Résultats : 12985 Légionelloses ont été déclarées entre 2011 et 2019. Une exposition à un AAS a été rapportée pour 106 patients (0.8%). Parmi ces cas, une comparaison entre souche clinique et l'eau de l'AAS a été demandée pour 19 cas (18%). 1/16 prélèvement d'AAS était positif en culture et 7/12 en qPCR. Trois comparaisons ont été contributives. L'une d'entre elle a montré une différence de ST entre la souche clinique (ST1) et environnementale (ST36). Une autre a montré des résultats comparables entre la souche clinique et d'AAS (compatible ST1). Pour le dernier cas, nous avons isolé une souche endémique ST23 chez le patient et dans l'eau d'AAS. Le WGS a montré que ces souches étaient phylogénétiquement reliées.

Conclusion : Les AAS et autres appareils d'aérosolisation à visée médicale sont des sources potentielles de Légionellose mais ont rarement été investigués. Pour la première fois, nous confirmons cette source de contamination pour un patient grâce au WGS. Les enquêtes environnementales sont souvent difficiles à mener du fait de la rareté des souches environnementales disponible. Ceci est dû au faible volume d'eau dans les AAS, ou de leur nettoyage après utilisation. Notre étude montre que des techniques sensibles de qPCR ou WGS peuvent améliorer la détection de Légionelles dans ces eaux. Il est important que ces prélèvements soient systématiquement investigués en tant que source potentielle chez tout patient qui en a l'usage.

Depuis 2019, 5 comparaisons entre des souches cliniques et des eaux d'AAS nous ont été adressées. Aucune enquête n'a permis d'identifier la souche responsable du cas clinique.

3.4.4.3 Identification de source de contamination inhabituelle

* **Cas relié à un diffuseur d'arôme.** Suite à un cas de légionellose, le CNR a reçu et analysé une souche de *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 isolée d'un réservoir d'eau dans un **diffuseur d'arôme** probablement rempli par la patiente à son domicile. La patiente transplantée pulmonaire était hospitalisée depuis 14 jours au début des symptômes évocateurs de légionellose. La mise en culture d'un prélèvement de crachat s'est avérée positive à *L. pneumophila* séro-groupe 1. Les sources d'expositions ont été investiguées. L'eau du réseau d'eau chaude sanitaire de la chambre de l'hôpital occupée par la patiente s'est avérée négative en culture. La patiente utilisait un humidificateur qu'elle avait rempli à domicile d'eau du robinet. Le réservoir de l'humidificateur a été analysé et s'est avéré positif en culture avec 300 UFC/L de Lp1. Les souches cliniques et environnementales ont été analysées par séquençage du génome complet, elles présentaient un « ST1 » dont l'analyse de génome complet a permis d'identifier un lien phylogénétique entre les souches. Un résumé à propos de ce cas a été accepté pour ECCMID 2020.

* **Cas groupés liés à une chaufferie à biomasse collective à Strasbourg en 2019** Nous avons connu une épidémie de 28 cas légionellose dans la région de Strasbourg à Lp1 ST62, impliquant le condenseur d'une chaufferie à biomasse collective, source de contamination jamais décrite dans la littérature. Le WGS a permis de confirmer le rôle de cette source pour les 28 cas et auxquels ont été rattachés 2 cas diagnostiqués plus de 2 ans avant l'épidémie alors que la chaufferie était en fonctionnement. Au cours de cet épisode, des cas ont été enregistrés jusqu'à 5,8 km de la source. Le détail de cette investigation est disponible au paragraphe 3.5.2.

* **Cas groupés liée à un centre de balnéothérapie impliquant 2 souches de *L.pneumophila* différentes.** A Montpellier (décembre 2016 à juillet 2017), 18 cas de légionellose ont été identifiés potentiellement en lien avec un cabinet de kinésithérapie, 8 ayant reçu des soins dans ce cabinet (dont l'expert en génie climatique missionné par l'ARS) et 10 ayant fréquenté le quartier (dont un habitant vivant à l'étage supérieur du cabinet). L'enquête environnementale a ainsi permis de confirmer le cabinet de kinésithérapie comme source d'infection avec des souches environnementales identiques à 5 souches cliniques disponibles. Cet épisode épidémique est atypique pour 2 raisons : (1) un centre de kinésithérapie est responsable de cas chez des personnes n'ayant pas fréquenté l'établissement ; (2) au niveau microbiologique deux souches étaient présentes au niveau de la source de contamination, les patients se sont contaminés par l'une ou par l'autre de ces deux souches (ce qui est rarement observé). Le détail de cette investigation est disponible au paragraphe 3.5.2.

3.4.5 Collaborations avec d'autres CNR et/ou laboratoires experts (santé animale, environnementale, alimentaire...)

Les collaborations dans le domaine de l'environnement se font dans le cadre de l'envoi de souches environnementales pour l'aide à l'identification précise ou dans le cadre de l'investigation de cas. Ces échanges sont réguliers par téléphone ou messagerie électronique. Le CNR est accrédité pour la détection des légionelles dans l'eau. Des échanges avec les laboratoires environnementaux sont réguliers sur ce point. Le CNR a également une expertise dans la détection de légionelles dans des environnements non soumis à l'accréditation, en particulier dans les environnements complexes. Nous pouvons avoir des échanges avec les laboratoires environnementaux sur les techniques employées.

En dehors des laboratoires environnementaux qui nous envoient des souches pour identification ou typage, nos partenaires comprennent notamment la Direction générale de la prévention des risques (DGPR) - Bureau de la qualité de l'eau (EA4) (successivement Yannick Pavageau, Moina Drouode, Beatrice Jedor et Marjorie Brou), l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), l'Agence Française de Normalisation (AFNOR), des fournisseurs de kits (BioRad, PallGeneSystems, Aquatools, BioMérieux, Oxoïd, IDEXX, Millipore...).

Les textes réglementaires français prévoient l'utilisation de la méthode normalisée NF T90-431 : 2017 pour la recherche et le dénombrement des *Legionella pneumophila* et *species*. Cette méthode par culture a plusieurs avantages dont la disponibilité de souches pour conduire les investigations épidémiologiques et la disponibilité de seuil d'action. Nous avons cependant œuvré durant de nombreuses années, en particulier dans les années 2010 pour élargir les méthodes de détection de *Legionella* dans l'eau à la méthode PCR et autres méthodes alternatives (culturelles ou non). Un des points critiques de la méthode actuelle de référence est le délai parfois jugé trop long pour la mise en œuvre rapide des mesures de gestion des risques. Le laboratoire d'hydrogéologie de l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) (Thierry Chesnot) a été missionné par la DGS pour une étude d'expertise de l'efficacité des méthodes alternatives de détection des légionelles dans l'eau. En 2020, une collaboration avec le laboratoire d'hydrologie de Nancy (Thierry Chesnot) d'échange de données et d'expertise avait pour but d'évaluer la fiabilité des résultats présomptifs pour les analyses de *L. pneumophila* obtenus selon la norme NF T 90-431 à J5 ou J7 post-ensemencement. Cette étude s'inscrivait dans une démarche gouvernementale afin d'assurer la sécurité des ERP (Etablissement Recevant du Public) amenés à rouvrir après une période de confinement, et cela le plus rapidement possible sans risque sanitaire. Au total 52 laboratoires ont participé à cette étude, permettant l'exploitation de 3483 échantillons.

Dans le cadre du développement de l'utilisation de la méthode PCR, nous distribuons le matériel de référence - ADN étalon pour la quantification des légionelles dans l'eau aux laboratoires environnementaux français et étrangers ; Partenariat avec LGC Standards, distributeur de matériaux de référence en microbiologie, afin qu'ils distribuent l'ADN étalon et le contrôle quantitatif auprès des potentiels clients à l'étranger. Ces matériaux sont disponibles sur le site : <http://www.lgcstandards.com>. L'utilisation de cet étalon est indiquée dans la norme NF T 90-471.

Collaborations avec les CNR Européens

Une collaboration avec le département de microbiologie du Centre hospitalier de Belgrade en Serbie a permis en 2020 de confirmer par sérologie un diagnostic de légionellose posé chez eux par PCR (cf. 3.2.1). Cette collaboration a été l'occasion d'échanger sur les conditions de mise en culture des *Legionella* (milieux de culture, pourcentage de CO₂, durée d'incubation, ...) et fin 2021, le département de microbiologie du CH de Belgrade a isolé sa première souche de *Legionella pneumophila*.

Sevre pneumonia caused by *Legionella pneumophila* detected by a multiplex polymerase chain reaction assay and confirmed by serology. Jovanovic M. et al. European Journal of Inflammation Vol 20 :1-5.

Dans le cadre d'enquêtes impliquants des patients d'autres nationalités, le CNR peut être amené à échanger et travailler avec les CNR des autres pays concernés. Ceci a notamment été le cas lors de l'épisode de fièvre de Pontiac en Belgique où des travailleurs transfrontaliers étaient atteints (cf. 3.2.1 et annexe 8) et lors de l'épisode de cas groupés à Béziers qui concernait des patients Hollandais (cf.annexe 8).

Une collaboration avec le CNR des IST a été réalisée en 2020 pour la mise en place d'une plaque MICRONAUT de détection de résistance aux antibiotiques adaptés aux deux pathogènes *Legionella* et *Mycoplasma* pour faciliter la distribution et la commercialisation (Cécile Bébear, Sabine Peyrere).

3.4.6 Contribution aux réseaux internationaux de surveillance et d'expertise (ECDC, OMS)

ECDC - Nomination comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen pour l'ECDC (Sophie Jarraud, depuis 2010)

Le CNR collabore avec le réseau européen de surveillance des légionelloses **ELDSNet** (European Legionnaires' Disease Surveillance Network). Le CNR participe tous les ans aux réunions et aux activités de ce réseau. Les membres de ELDSNet (2 par pays européens) se réunissent une fois par an. Nous avons accueilli la réunion ELDSNet à Lyon en août 2018. Le CNR a été invité à présenter aux épidémiologistes les moyens d'obtention de résultats de WGS et l'interprétation des données en 2018 (C. Ginevra), à présenter avec SpF en 2021 la situation de la légionellose en France en 2020 dans le contexte Covid-19 (S Jarraud , C Campese), participer en 2021 à la présentation de SpF de l'épidémie de légionellose à Strasbourg en 2019 (S Raguét).

En 2019, le CNR a notamment participé à la décision d'ajouter la PCR dans la définition des cas de légionellose confirmés au niveau européen.

OMS-Europe, CEE-NU. Participation en tant qu'expert à la 5^{ème} session de la réunion des Parties du Protocole sur l'eau et la santé où sont invités les ministres de la santé et de l'environnement des 53 pays de la région Europe le **19-21 Nov 2019, Belgrade, Serbie**. Cette réunion intergouvernementale de haut niveau vise à faire progresser le programme d'action dans le domaine de l'eau, de l'assainissement et de la santé dans la région paneuropéenne à l'appui du Programme de développement durable à l'horizon 2030. Au regard des données épidémiologiques les membres du bureau du Protocole ont mis en avant lors d'un *side-event* le sujet *Legionella* et légionellose. Le CNR a participé au *side-event* en tant qu'expert et représentant l'Europe avec une courte intervention: *Legionella* bacteria surveillance in France and Europe (S. Jarraud).

OMS-Europe, UNECE. Protocole sur l'eau et la santé - A la suite de la 5^{ème} session de la réunion des Parties du Protocole sur l'eau et la santé, **une réunion d'expert sur la prévention et le contrôle des légionelloses dans la région pan - Européenne a eu lieu du 30 nov – au 2 Dec 2021 (session en distanciel).**

Le CNR a été invité à une intervention lors de la Session 3. Clinical surveillance and outbreak management of legionellosis: main approaches and country experiences - *Good practices and specific approaches to strengthen the clinical surveillance and outbreak management of legionellosis.*

France: Experience of setting up and implementing clinical surveillance of legionellosis and use of surveillance data for *Legionella* risk management strategies and actions (Sophie Jarraud)

EUCAST - Sur le plan de la surveillance de la **sensibilité aux antibiotiques**, le CNR a participé à la mise en place au sein de l'EUCAST de méthode de détection de la résistance de *L. pneumophila* (G. Descours, S. Jarraud, G. Lina). Gérard Lina est membre du Steering committee de l'EUCAST.

ESCMID – ESGLI - Concernant les aspects plus microbiologiques, le CNR a une forte implication au groupe d'étude ESGLI (ESCMID Study group for *Legionella* Infections). S. Jarraud a été élu à l'**executive committee de ESGLI** (Présidente 2020 – 2022, trésorière 2016-2020 et depuis 2022). Participation aux réunions du comité exécutif (1 fois /

mois) en distanciel.

Plusieurs impulsions de collaborations européennes ont été réalisées grâce à ce groupe d'étude : étude européenne sur l'évaluation de kits de détection des antigènes dans les urines (coordinatrice S. Jarraud) ; étude européenne sur la détection de la résistance (coordinateur Brad Spiller - Ecosse) ; étude sur la mise au point d'une PCR spécifique su ST1 (en collaboration avec Israël, le Royaume Uni et la France).

Dans le cadre du développement et de la standardisation du NGS à des fins épidémiologiques, **le groupe de travail sur le Next-generation sequencing (NGS)** auxquels le CNR (Christophe Ginevra, Sophie Jarraud) participe a été réactivé fin 2021 - 2022. En 2016, 180 génomes (fastq et fasta) ont été envoyés aux membres du groupe de travail pour la mise en place d'une méthode standardisée européenne de cgMLST. Ce groupe a évalué plusieurs schémas de cgMLST et de eMLST. Un schéma commun de eMLST de 47 gènes a été retenu pour l'avenir. Une base de données commune des allèles et eST est en cours de construction.

Les données de typage par SBT de toutes les souches d'origine clinique et des souches environnementales en lien avec une investigation, sont systématiquement envoyées afin de renseigner la **base de données du réseau EWGLI** (www.ewgli.org) avec comme renseignements : le numéro CNR de la souche, la date d'isolement, la ville d'isolement, le département d'isolement, les données du SBT et des notions épidémiologiques quand elles sont connues comme : la notion de cas groupés, de cas nosocomiaux, de cas liés au voyage. Cet envoi a été temporairement suspendu le temps de la refonte du site internet de soumission mais devrait reprendre courant 2022

Plusieurs membres du CNR ont participé aux comités scientifiques de différents congrès qui ont notamment pour thème la surveillance des légionelloses : congrès ESGLI à Athènes en 2019 ; 9th international Conference on *Legionella* à Rome en 2017 ; 10th international Conference on *Legionella* en 2020 au Japon.

3.5 CONTRIBUTION A L'ALERTE

3.5.1 Procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de cas groupés et de phénomènes anormaux

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

La détection de tout phénomène anormal que ce soit dans le domaine clinique (forme atypique, forme persistante, cas chez les nouveaux né...), diagnostic (problème de kits), épidémiologique (cas groupés) ou microbiologique (apparition de clones émergents, de résistance aux antibiotiques) a conduit à une information de nos correspondants de SpF. Lors de l'investigation de cas groupés, une cellule peut être mise en place constituée selon les besoins avec un représentant du CNR et l'ARS, SpF, CIRE, Cliniciens, EOH, CCLIN, DGS.

Le CNR informe régulièrement et rapidement SpF en cas d'identification chez deux patients géographiquement proches de souches non distinguables par les outils moléculaires ou atypiques. Cinq alertes plus spécifiques ont été faites :

- **Identification de souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 résistantes aux macrolides**

En septembre 2021, dans le cadre de l'enquête autour d'un cas de légionellose survenu en juin 2021, et pour lequel aucune souche clinique n'avait été isolée mais pour lequel la technique de nested-SBT avait permis l'amplification de 4 gènes sur les 7 analysés, le CNR a été amené à réaliser un WGS de 8 souches environnementales de Lp1 isolées du réseau d'ECS d'un hotel fréquenté par le patient pendant la période d'incubation.

Des mutations ribosomiques associées à un haut niveau de résistance aux macrolides ont été identifiées dans tous les génomes analysés, et confirmées par un antibiogramme (CMI des macrolides x1000).

Le CNR a immédiatement alerté SpF de cet isolement et a déclenché une réunion avec ses correspondants de SpF et des ARS Hauts-de-France et Auvergne-Rhone-Alpes concernées (lieu fréquenté et lieu de résidence du patient). Une action avait déjà été menée par l'ARS ARA devant des dépassements de seuil réglementaire sur le réseau de l'hôtel et la

défectuosité de la pompe de recirculation d'eau chaude sanitaire (ECS), ayant permis un retour à la normale (prélèvements de contrôle à 3 semaines montrant des concentrations en légionelles < 10 UFC/L).

Afin d'explorer une éventuelle recolonisation du réseau d'ECS, le CNR a demandé des prélèvements à distance qui ont été réalisés en décembre 2021, montrant à nouveau des dépassements de seuil et la persistance des souches résistantes aux macrolides, exposant les clients de l'hôtel à un risque infectieux avec échec de traitement (les macrolides étant recommandés en 1^{ère} intention dans les légionelloses). Une alerte a à nouveau été donnée, et des mesures correctives ont été demandées par l'ARS.

De nouveaux prélèvements sur le réseau d'ECS sont prévus en 2022 afin de mener une veille continue sur ce réseau à risque. L'ARS et le CNR ont également interrogé les établissements soumis à réglementation sur ce réseau desservant plusieurs communes et le CH situé à proximité, afin de déterminer si d'autres établissements seraient contaminés par ces souches ou si cette colonisation reste limitée au réseau d'ECS de l'hôtel ; aucune souche supplémentaire n'a été transmise pour analyse au CNR (seuils réglementaires respectés ou absence de souche disponible). Par ailleurs, la cartographie du réseau d'eau et des affluents a été étudiée afin d'identifier d'éventuelles zones pouvant être contaminées par des macrolides (élevage animal, pisciculture notamment). Aucune exploitation de ce type n'a été identifiée. Les rapports d'analyses environnementales réalisées sur les affluents montrent des concentrations en biocides au-delà des seuils réglementaires. Des investigations permettant des dosages de macrolides sont prévues. Nous n'avons pas identifié à ce jour à quelle pression de sélection ces souches ont été soumises. L'hypothèse d'une pression de sélection par biocides, croisée avec les macrolides est évoquée et fera l'objet des travaux de recherche (cf paragraphe 7.1.6.6.).

- **Alerte sur l'identification de nombreux cas contaminés par une souche ST259 à Aurillac.**

Les cas de légionellose à Aurillac (n=22 sur la période 2008-2017) faisaient l'objet d'une attention particulière car la grande majorité d'entre eux présentait le même profil de souche : pulsotype F, ST 259, sous-groupe Philadelphia, suggérant une source commune d'exposition. Le premier semestre 2018 a été marqué par la survenue de 7 cas dont 5 entre le 5 et le 21 juin. Parmi ces 7 cas, un seul réside à Aurillac ; les 6 autres cas sont domiciliés dans d'autres communes du Cantal mais tous rapportent un ou plusieurs déplacements à Aurillac, dans une zone restreinte définie au cours des précédentes investigations, située au sud de la ville et comprenant des centres commerciaux, des entreprises et des quartiers résidentiels. Plusieurs sources potentielles de contamination ont été recensées (3 tours aéro-réfrigérantes, 1 station d'épuration des eaux usées, 1 industrie avec des laveurs d'air).

En juin 2018, en raison du caractère temporel groupé des cas et en lien avec la préfecture du Cantal, l'ARS a relancé les investigations sur le secteur précédemment défini. Les actions suivantes ont été réalisées :

- prélèvements dans les bassins de la station d'épuration des eaux usées de la ville le 15 juin, avec mise en culture et PCR ; aucune légionelle n'a pu être isolée par culture (contamination fréquente par de la flore interférente) ; un seul prélèvement était positif pour *L. pneumophila* en quantité inférieure à la limite de quantification, mais négatif pour *L. pneumophila* séro-groupe 1 ce qui n'a pas permis de réaliser de typage directement sur le prélèvement ;
- prélèvements inopinés sur 3 Tars d'Aurillac le 29 juin : légionelles non détectées par culture (présence d'une flore interférente) ;
- demande des auto-contrôles réalisés en avril 2018 sur les laveurs d'air : légionelles non détectées par culture ;
- investigation d'une installation frigorifique d'une grande surface avec condensateur en toiture en juillet 2018 : légionelles non détectées par culture.

Pour 2019, l'ARS ARA a planifié le recensement des installations de climatisation dans le secteur tertiaire en s'appuyant sur les frigoristes et le Service départemental d'incendie et de secours (SDIS) qui effectue tous les ans des visites de conformité (risque incendie) dans les ERP.

Le caractère groupé des cas survenus en mai-juin 2018 à Aurillac est superposable à l'épidémiologie particulière observée dans certaines régions de France sur la même période. Néanmoins, la récurrence d'une même souche clinique est en faveur de la persistance probable d'une source commune de contamination, non identifiée à ce jour.

En raison d'une contamination fréquente des prélèvements environnementaux, il a été convenu avec l'ARS ARA que ces prélèvements nous soient adressés pour analyse complémentaire avec co-culture ambiante et PCR spécifique du séro-groupe 1 en particulier.

Depuis ce dernier épisode de 2018, aucun nouveau cas groupé autour d'Aurillac n'a été signalé.

- **Cas de légionellose au retour de la Mecque (août – septembre 2018)**

En août – septembre 2018, le CNR a alerté Santé publique France après identification de 3 souches ST211 isolées chez deux patients de la région lyonnaise et un patient hospitalisé à Strasbourg, tous au retour d'un pèlerinage à la Mecque. La base de données ESGLI faisait à ce moment-là état de 10 souches cliniques ST211 notifiées au niveau européen, dont 6 associées à un voyage et parmi celles-ci 2 notifiés en Arabie Saoudite. Ces données ont été transmises par SpF au réseau de surveillance ELDSNet qui n'a pas rapporté de cas contemporain aux cas français à Lp1 ST211 dans d'autres

pays en Europe. Les données d'ELDSNet rapportent depuis 2015, 11 cas associés à la Mecque (1 en 2015, 2 en 2016, 5 en 2017 et 3 en 2018 correspondant à nos cas). Pour l'un des cas, la notion d'une souche à ST211 était rapportée. Par ailleurs, notons qu'une souche clinique ST211 avait déjà été isolée chez un patient strasbourgeois au retour de la Mecque en 2011.

Au total, depuis 2011, au moins 12 cas ont été rapportés au retour d'un pèlerinage à la Mecque, 5 sont associés à un ST211 ; pour les autres cas le ST n'est pas connu. Ces données nous imposent une vigilance particulière pour ce ST211 et les cas associés à la Mecque.

Depuis 2018 aucun nouveau cas avec ce ST n'a été détecté au niveau national.

- **Cas de légionellose à *L. longbeachae* en vendée**

Entre le 15/05/2020 et le 29/07/2021, 5 cas de légionellose à *Legionella longbeachae* ont été diagnostiqués au CNR-L par PCR sur des prélèvements respiratoires adressés par le CHD de Vendée. Ces cas ont fait l'objet d'une déclaration obligatoire à l'ARS local. Il s'agissait de 5 hommes, âgés de 54 à 82 ans, domiciliés dans différentes communes de Vendée. 2 sont décédés. Tous les cas ont manipulé du terreau, du compost et/ou du fumier durant leur période d'exposition ou ils possédaient ce type de produits à domicile. Cependant aucun produit commun aux cas n'a été identifié et aucune autre source d'exposition évidente n'a pas été retrouvée par ailleurs. Pour 4 de ces patients, des analyses des terreaux ont été réalisées au CNR (cf. résultats en 3.2.4.3). Aucun cas n'a été observé sur la période automne/hiver (septembre 2020 à juin 2021).

- **Investigations de cas à *L. gratiana* sur l'île de la Réunion (février, mars 2018)**

Deux cas à *L. gratiana* ont été diagnostiqués à la Réunion (et un troisième suspecté par sérologie) dans un contexte d'augmentation du diagnostic de cas de légionellose. Nous avons investigué la réalité de cette augmentation du nombre de cas (à *L. pneumophila* et *L. non pneumophila*). L'espèce *L. gratiana* n'ayant jamais été décrite dans la littérature comme responsable de cas de légionellose, nous avons alerté l'ARS et SpF car une source de contamination commune était largement suspectée. Le seul lien entre les 2 patients étant l'hôpital (en dehors des périodes classiques de durée d'incubation), nous avons conseillé des investigations à ce niveau. Les investigations n'ont pas permis d'identifier la source.

Dans le but de reconstruire les génomes de ces souches et en absence d'isolats clinique, une analyse par séquençage shotgun à partir des ADN des prélèvements respiratoires a été effectuée. Elle n'a malheureusement permis d'obtenir que des fragments de génomes partiels.

3.5.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

L'ensemble des mesures réglementaires mises en place depuis 1990, ont probablement permis de limiter le nombre et l'ampleur des épidémies car seuls trois épisodes de cas groupés ont été identifiés au cours de ces 10 dernières années avec pour source de contamination une TAR à l'origine de 8 cas en 2012, une installation de balnéothérapie pour 18 cas en 2017 et une chaufferie collective impliquant 28 cas en 2019.

Ainsi, les 2 épidémies investiguées par le CNR au cours de la précédente mandature ont concerné des sources de contaminations inhabituelles.

* **Epidémie de Montpellier (décembre 2016 – Juillet 2017) liée à un centre de balnéothérapie**

L'ARS a déclaré une sur-incidence de cas de légionellose dans l'Hérault avec une première alerte suite à la déclaration de 4 cas entre le 21/12/2016 et le 01/01/2017, chez des personnes résidant dans le quartier Gambetta de Montpellier. Au total 18 cas relatifs à cette situation ont été retenus entre mi-décembre 2016 et juillet 2017. L'analyse des expositions potentielles des cas a montré que 8 cas (dont 5 survenus en juillet), faisaient partie de la patientèle d'un même cabinet de kinésithérapie, dont l'expert en génie climatique missionné par l'ARS pour intervenir dans le cabinet de kinésithérapie. Parmi les 8 cas, 4 ont eu des séances de balnéothérapie précédées et/ou suivies de douche et 3 n'en ont pas eu. L'expert a manipulé l'ensemble des installations sans port d'équipement de protection individuelle. L'analyse des trajets urbains des dix autres cas atteints de légionellose mais n'ayant pas fréquenté le cabinet de kiné durant les 14 jours d'incubation possible de leur maladie relève pour 6 cas, un ou plusieurs passages hebdomadaires sur le cours Gambetta où se situe le cabinet. Les 4 autres cas ont fréquenté le quartier. Parmi les dix cas qui n'ont pas eu de soins dans le cabinet de kinésithérapie, un cas habite à l'étage supérieur du cabinet.

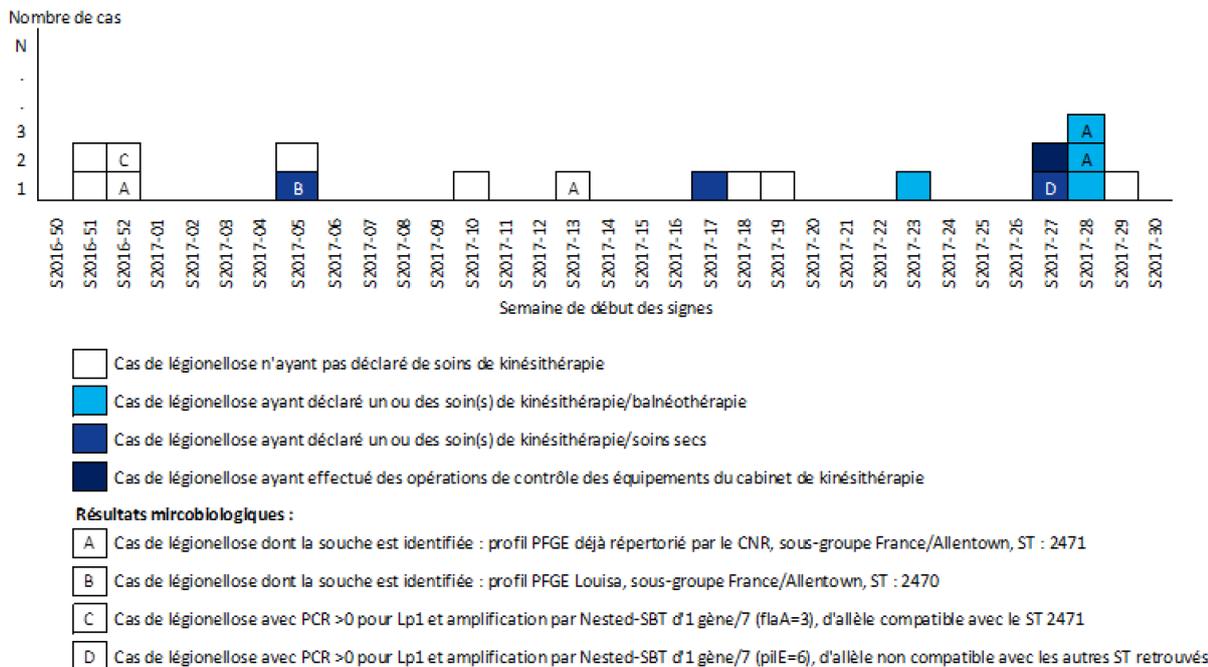


Figure 32. Courbe épidémique des cas de légionellose en fonction du début des signes cliniques

L'investigation du cabinet de kiné a mis en évidence des anomalies sur le réseau d'eau chaude sanitaire (températures insuffisantes), des désordres (fuites) autour des équipements de la piscine, et l'absence d'entretien d'une installation de pompe à chaleur air-air avec circuit d'eau secondaire et cassettes réfrigérantes, qui climatise et chauffe l'ensemble des locaux. L'arrêt de la pompe à chaleur a été demandé par l'ARS le 12 mai 2017 puis un arrêt complet des installations le 12 juillet 2017. De plus les investigations *in situ* ont permis de constater que la bouche d'extraction de la pompe à chaleur et l'aération du local technique du cabinet débouchaient sur la terrasse du patient domicilié dans l'immeuble. Ces constatations sont des arguments en faveur d'une source commune localisée dans le cabinet de kinésithérapie avec une exposition simultanée de la patientèle et des riverains et passants.

L'enquête environnementale a ainsi permis de confirmer le cabinet de kinésithérapie comme source d'infection avec des souches environnementales identiques à 5 souches cliniques disponibles. Pour un des patients, l'eau chaude sanitaire dans une résidence pour personnes âgées a pu être identifiée comme source de l'infection.

Cet épisode épidémique est atypique pour 2 raisons : (1) un centre de kinésithérapie est responsable de cas chez des personnes n'ayant pas fréquenté l'établissement ; (2) au niveau microbiologique deux souches étaient présentes au niveau de la source de contamination, les patients se sont contaminés par l'une ou par l'autre de ces deux souches (ce qui est rarement observé).

*** Epidémie à Strasbourg (novembre – décembre 2019) lié à un chauffage collectif à biomasse.** Cet épisode de 28 cas groupés de légionellose survenus dans la région de Strasbourg a identifié pour la première fois le risque d'une centrale de chauffage à biomasse d'un éco-quartier. Le CNR a réceptionné des échantillons pour 18 patients (prélèvements respiratoires ou ADN) dont les premiers symptômes sont apparus entre le 31 octobre et le 20 décembre 2019. Au total, nous avons pu conclure que 12 patients ont été infectés par une souche de profil ST 62, et pour 2 patients les résultats incomplets étaient compatibles avec un ST 62. Les génomes complets des 9 souches cliniques disponibles pour 9 patients partageaient le même ancêtre commun le plus récent, suggérant source de contamination commune. Après l'expertise de plusieurs sites suspectés (TARs d'Illkirch, Kirn et Cristal Union (souches de profils non ST62) ou de la blanchisserie du CHU de Strasbourg (prélèvements négatifs)), des prélèvements environnementaux ont été réalisés au niveau des **eaux de la chaufferie à biomasse** du quartier des Tanneries où une forte concentration de Lp1 (10^5 - 10^6 UFC/L) a été identifiée. Les 8 souches Lp1 ST62 isolées de l'eau de condensat du bac de relevage partageaient avec les 9 souches d'origine clinique le même ancêtre commun le plus récent (0 à 2 SNPs de différence), confirmant cette source de contamination.

Au cours de cet épisode, des cas inclus avec ST62 ont été enregistrés jusqu'à 5,8 km de la source. Cette chaufferie à biomasse étant en fonctionnement depuis 2016, nous avons répertorié en collaboration avec l'ARS les cas avec souches ST62 disponibles envoyées au CNR par le département 67 entre 2016 et l'épisode de cas groupés de 2019 et nous les avons analysées par WGS. Parmi les 4 cas avec souches ST62 identifiés, les résultats de WGS montrent que 2 ne sont pas liés à la souche environnementale de décembre 2019 (> 6000 SNPs). Les 2 autres appartiennent au même cluster et

partagent le même ancêtre commun le plus récent que les souches d'origine clinique et environnementale de l'épisode de cas groupés de 2019 (1 SNP de différence). Ces 2 cas appartenaient à un cluster de 4 cas en janvier 2019 habitant ou séjournant dans la partie Ouest de Strasbourg, pour lesquels les investigations n'avaient pas permis d'identifier la source de contamination (Figure 32).

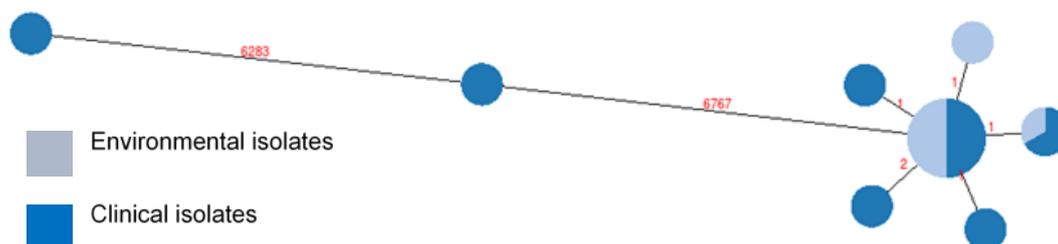


Figure 33. Minimum spanning tree of 21 *L. pneumophila* serogroup 1 ST62. Light blue charts represent environmental isolates from the collective biomass heating plant, dark blue charts represent the isolates from the patients, red numbers represent SNPs.

* Autres investigations de cas groupés

En dehors de ces deux épisodes épidémiques, de nombreux cas groupés (de 2 à 10 cas) sont investigués chaque année. Un total de 27 investigations a été mené de 2017 à 2021 avec une variabilité forte en fonction des années (2017, n=4 ; 2018, n= 8 ; 2019, n =3 ; 2020, n = 3 ; 2021, n = 9).

Les épisodes de forte incidence comme en juin 2018 et l'été 2021 entraînent des demandes de comparaison dans un contexte de surincidence régional qui s'avère souvent sans lien avec une source de contamination commune. Ceci a été le cas de 4 enquêtes en 2018 et de 3 enquêtes en 2021.

Il est également retrouvé au cours des années des sources ou des lieux identiques responsables de cas groupés. Ceci a été le cas d'une résidence à Palavas qui a fait l'objet d'investigation de cas groupés régulièrement de 2016 à 2021, ainsi que les thermes de Saujon impliqués régulièrement depuis 2019 dans des investigations de cas groupés et enfin aux alentours de Rochefort, 2 enquêtes ont été menées, une en 2019 et l'autre en 2021.

Enfin, les deux dernières années ont été marquées par une hausse des contaminations à *L.longbaechae* en Vendée, amenant à des investigations de terres et terreaux sans retrouver de lien entre les patients.

Les précisions sur l'ensemble des investigations des cas groupés de 2017 à 2020 (n=27) sont présentées en Annexe 8.

4 LISTE DES PUBLICATIONS

4.1 PUBLICATIONS NATIONALES

2020

1. La légionellose en France: importante augmentation du nombre de cas en 2018. Christine Campèse (christine.campese@santepubliqueffrance.fr), Ghislaine Descours, Sibylle Bernard-Stoecklin, Laetitia Beraud, Catherine Maine, Anne-Gaelle Ranc, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud. 11 Feb 2020, **BEH** 4.

2019

2. Cattan S, Thizy G, Michon A, Arlet JB, Lanternier F, Lebeaux D, Jarraud S, Pouchot J, Lafont E. *Legionella* spp: An update. **Rev Med Interne**. 2019 Dec;40(12):791-798.
3. Hugo Testaert, Florence Ader, Sophie Jarraud. Legionelloses **EMC Maladie Infectieuse**, Juillet 2019, Ed Elsevier Masson SAS 2019
4. La légionellose en France: importante augmentation du nombre de cas en 2018. Christine Campèse (christine.campese@santepubliqueffrance.fr), Ghislaine Descours, Sibylle Bernard-Stoecklin, Laetitia Beraud, Catherine Maine, Anne-Gaelle Ranc, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud. 11 Feb 2020, **BEH** 4.

2016

5. Leruste A, Rambaud J, Picard C, Jarraud S, Ferroni A, Lawrence C, Renolleau S. Successful pediatric ECMO in a rare case of septic shock due to a community-acquired *Legionella* infection. **Med Mal Infect.** 2016 Oct 31.

2015

6. Campese C, Descours G, Lepoutre A, Beraud L, Maine C, Che D, Jarraud S. Legionnaires' disease in France. **Med Mal Infect.** 2015 Mar;45(3):65-71.
7. Baume M, Beraud L, Jarraud S. Impact de la nouvelle norme de détection des légionelles dans l'eau sur l'interprétation des résultats d'analyse, **Alin&as Lettre d'information** du CCLIN Sud-Est 2015
8. CIRE Rhône-Alpes – CNR des légionelles. **Bulletin de Veille Sanitaire (BVS)** Numéro spécial / Légionellose 2014. Bilan épidémiologique de la surveillance de la légionellose en Rhône Alpes, 2014, Octobre 2015

2013

9. Perpoint T, Jamilloux Y, Descloux E, Ferry T, Chidiac C, Lina G, Étienne J, Jarraud S, Ader F. PCR-confirmed *Legionella non-pneumophila* meningoenophalitis. **Med Mal Infect.** 2013 Jan;43(1):32-4.

2012

10. Jamilloux Y, Jarraud S, Lina G, Etienne J, Ader F. *Legionella*, légionellose. **Med Sci (Paris)** 2012;28:639-45.
11. *Legionella* and Pontiac fever, **Orphanet** encyclopedia <http://www.orpha.net>, avril 2012.

Les publications n° 1, 4 et 6 ont été faites en collaboration avec SpF. La publication n° 8 a été faite en collaboration avec l'ARS-CIRE Rhône-Aples.

4.2 PUBLICATIONS INTERNATIONALES

2021

1. Allam C, Gaymard A, Descours G, Ginevra C, Josset L, Bouscambert M, Beraud L, Ibranosyan M, Golfier C, Friggeri A, COVID-19 diag HCL consortium, Lina B, Campese C, Ader F, Jarraud S. Co-infection with *Legionella* and SARS-CoV-2, France, March 2020, **Emerg Infect Dis.** 2021 Nov;27(11):2864-68. PMID:34469708.
2. Guillemot J, Ginevra C, Allam C, Kay E, Gilbert C, Doublet P, Jarraud S, Chapalain A. TNF- α response in macrophages depends on clinical *Legionella pneumophila* isolates genotypes. **Virulence**, accepté le 19 décembre 2021. PMID:35030980.
3. Kamus L, Roquebert B, Allyn J, Allou N, Valance D, Simon C, Jaffar-Bandjee M-C, Descours G, Jarraud S, Miltgen. Severe bilateral pleuropneumonia caused by *Legionella sainthelensi*: a case report. **BMC Infect Dis.** 2021 Sep 17;21(1):966. PMID :34535079.
4. Corre MH, Mercier A, Bouteiller M, Khalil A, Ginevra C, Depayras S, Dupont C, Rouxel M, Gallique M, Grac L, Jarraud S, Giron D, Merieau A, Berjeaud JM, Verdon J. Bacterial Long-Range Warfare: Aerial Killing of *Legionella pneumophila* by *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiol Spectr.** 2021 Sep 3 ;9(1). PMID : 34378969.
5. Portal E, Descours G, Ginevra C, Mentasti M, Afshar B, Chand M, Day J, Echahidi F, Franzin L, Gaia V, Lück C, Meghraoui A, Moran-Gilad J, Ricci ML, Lina G, Uldum S, Winchell J, Howe R, Bernard K, Spiller OB, Chalker VJ, Jarraud S; ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI). *Legionella* antibiotic susceptibility testing : is it time for international standardization and evidence-based guidance ? **J Antimicrob Chemother.** 2021 Apr 13 ;76(5) :1113-16. PMID :33608737.

2020

6. Pouderoux C, Ginevra C, Descours G, Ranc AG, Beraud L, Boisset S, Magand N, Conrad A, Bergeron-Lafaurie A, Jarraud S*, Ader F*. Slowly or non-resolving Legionnaires' disease: case series and literature review. **Clin Infect Dis.** 2020 Jun 26. PubMed PMID: 31242293.
7. Ginevra C, Chastang J, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). A real-time PCR for specific detection of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1 complex. **Clin Microbiol Infect.** 2020 Sep 13. pii: S1198-743X(19)30487-2. PMID: 31525518.
8. Couturier J, Ginevra C, Nesa D, Adam M, Gouot C, Descours G, Campese C, Battipaglia G, Brissot E, Beraud L, Ranc AG, Jarraud S, Barbut F. Transmission of Legionnaires' Disease through Toilet Flushing. **Emerg Infect Dis.** 2020 Jul;26(7):1526-1528. PMID: 32568063.

9. Pérez-Cobas AE, [Ginevra C](#), Rusniok C, [Jarraud S](#), Buchrieser C. Persistent Legionnaires' Disease and Associated Antibiotic Treatment Engender a Highly Disturbed Pulmonary Microbiome Enriched in Opportunistic Microorganisms. **mBio**. 2020 May 19;11(3). PMID: 32430469.
10. Souche A, Descours G, Ranc AG, Lina G, Jarraud S, Beraud L. Comparison of *Legionella* K-set® and BinaxNOW® *Legionella* for diagnosing Legionnaires' disease on concentrated urine samples. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2020 Sep;39(9):1641-1644. PMID: 32303927.

2019

11. Ibranosyan M, [Beraud L](#), Lemaire H, [Ranc AG](#), [Ginevra C](#), [Jarraud S](#), [Descours G](#). The clinical presentation of *Legionella* arthritis reveals the mode of infection and the bacterial species: case report and literature review. **BMC Infect Dis**. 2019 Oct 21;19(1):864.
12. [Ginevra C](#), [Chastang J](#), David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, [Jarraud S](#), Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). A real-time PCR for specific detection of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1 complex. **Clin Microbiol Infect**. 2020 Apr.
13. Poudroux C, [Ginevra C](#), [Descours G](#), [Ranc AG](#), [Beraud L](#), Boisset S, Magand N, Conrad A, Bergeron-Lafaurie A, [Jarraud S](#), [Ader F](#). Slowly or non-resolving Legionnaires' disease: case series and literature review. **Clin Infect Dis**. 2019 Jun 26.
14. [Baume M](#), Cariou A, Leveau A, [Fessy N](#), Pastori F, [Jarraud S](#), Pierre S. Quantification of Legionella DNA certified reference material by digital droplet PCR. **J Microbiol Methods**. 2019 Feb;157:50-53.
15. Durieux I, [Ginevra C](#), Attaiech L, Picq K, Juan PA, [Jarraud S](#), Charpentier X. Diverse conjugative elements silence natural transformation in *Legionella* species. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2019 Sep 10;116(37):18613-18618.
16. Gomez-Valero L, Rusniok C, Carson D, Mondino S, Pérez-Cobas AE, Rolando M, Pasricha S, Reuter S, Demirtas J, Crumbach J, Descorps-Declere S, Hartland EL, [Jarraud S](#), Dougan G, Schroeder GN, Frankel G, Buchrieser C. More than 18,000 effectors in the *Legionella* genus genome provide multiple, independent combinations for replication in human cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2019 Feb 5;116(6):2265-2273.

2018

17. [Descours G](#), Hannellet H, Reynaud JV, [Ranc AG](#), [Beraud L](#), Kolenda C, Campese C, [Lina G](#), [Ginevra C](#), [Jarraud S](#). Adaptation of the Amoebae Plate Test to recover *Legionella* strains from clinical samples. **J Clin Microbiol**, 2018;56(5).
18. Brunel R, [Descours G](#), Durieux I, Doublet P, [Jarraud S](#), Charpentier X. KKL-35 exhibits potent antibiotic activity against *Legionella* species independently of trans-translation inhibition. **Antimicrob Agents Chemother**, 2018;62(2).
19. Fleres G, Couto N, Lokate M, van der Sluis LWM, [Ginevra C](#), [Jarraud S](#), Deurenberg RH, Rossen JW, Garcia-Cobos S, Friedrich AW. Detection of *Legionella anisa* in Water from Hospital Dental Chair Units and Molecular Characterization by Whole-Genome Sequencing. **Microorganisms**. 2018 Jul 18;6(3).

2017

20. [Descours G](#), [Ginevra C](#), Jacotin N, Forey F, [Chastang J](#), Kay E, Etienne J, [Lina G](#), Doublet P, [Jarraud S](#). Ribosomal mutations conferring macrolide resistance in *Legionella pneumophila*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2017;61(3).
21. Massip C, [Descours G](#), [Ginevra C](#), Doublet P, [Jarraud S](#), Gilbert C. Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: the role of LpeAB efflux pump. **J Antimicrob Chemother**. 2017;72(5):1327-1333.
22. Vandewalle-Capo M, [Massip C](#), [Descours G](#), Charavit J, [Chastang J](#), Billy PA, Boisset S, [Lina G](#), Gilbert C, Maurin M, [Jarraud S](#), [Ginevra C](#). Minimum inhibitory concentration (MIC) distribution among wild-type strains of *Legionella pneumophila* identifies a subpopulation with reduced susceptibility to macrolides owing to efflux pump genes. **Int J Antimicrob Agents**, 2017;50(5):684-689.
23. [Ranc AG](#), Carpentier M, [Beraud L](#), [Descours G](#), [Ginevra C](#), Maisonneuve E, Verdon J, Berjeaud JM, [Lina G](#), [Jarraud S](#). *Legionella pneumophila* LPS to evaluate urinary antigen tests. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2017;89(2):89-91.
24. Hennebique A, Bidart M, [Jarraud S](#), [Beraud L](#), Schwebel C, Maurin M, Boisset S. Digital PCR for Detection and Quantification of Fluoroquinolone Resistance in *Legionella pneumophila*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2017 Aug 24;61(9).
25. David S, Afshar B, Mentasti M, [Ginevra C](#), Podglajen I, Harris SR, Chalker VJ, [Jarraud S](#), Harrison TG, Parkhill J. Seeding and Establishment of *Legionella pneumophila* in Hospitals: Implications for Genomic Investigations of Nosocomial Legionnaires' Disease. **Clin Infect Dis**. 2017 May 1;64(9):1251-1259.

26. Lanternier F, Ader F, Pilmis B, Catherinot E, Jarraud S, Lortholary O. Legionnaire's Disease in Compromised Hosts. **Infect Dis Clin North Am**. 2017 Mar;31(1):123-135

2016

27. David S, Rusniok C, Mentasti M, Gomez-Valero L, Harris SR, Lechat P, Lees J, Ginevra C, Glaser P, Ma L, Bouchier C, Underwood A, Jarraud S, Harrison TG, Parkhill J and Buchrieser C. Multiple major disease-associated clones of *Legionella pneumophila* have emerged recently and independently. **Genome Research**, 2016, Nov;26(11):1555-1564.
28. Botelho-Nevers E, Grattard F, Viallon A, Allegra S, Jarraud S, Verhoeven P, Marcuccilli A, Lucht F, Pozzetto B, Berthelot P. Prospective evaluation of RT-PCR on sputum versus culture, urinary antigens and serology for Legionnaire's disease diagnosis. **Journal of Infection** 2016 Aug;73(2):123-8
29. Mentasti M, Cassier P, David S, Ginevra C, Gomez-Valero L, Underwood A, Afshar B, Etienne J, Parkhill J, Chalker V, Buchrieser C, Harrison TG, Jarraud S. ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). Rapid detection and evolutionary analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 sequence type 47. **Clin Microbiol Infect**. 2016 Nov. 30
30. Compain F, Rossi B, Richaud C, Guerot E, Rostane H, Jarraud S, Podglajen I. Photo Quiz: A 44-year-old kidney transplant patient with pneumonia" **J Clin Microbiol**. 2016 Dec 28 :55(1) :1-2.
31. Answer to January 2017 Photo Quiz : Compain F, Rossi B, Richaud C, Guerot E, Rostane H, Jarraud S, Podglajen I. **J Clin Microbiol**. 2016 Dec 28;55(1):349-350.
32. Khodr A, Kay E, Gomez-Valero L, Ginevra C, Doublet P, Buchrieser C, Jarraud S. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Legionella. *Infection*, **Genetics and Evolution**. 2016 Sep;43:108-22.

2015

33. Campese C, Descours G, Lepoutre A, Beraud L, Maine C, Che D, Jarraud S. Legionnaires' disease in France. **Med Mal Infect**. 2015 Mar;45(3):65-71.
34. Beraud L, Gervasoni K, Freydiere AM, Descours G, Ranc AG, Vandenesch F, Lina G, Gaia V, Jarraud S. Comparison of Sofia Legionella FIA and BinaxNOW® Legionella urinary antigen card in two national reference centers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2015 Sep;34(9):1803-7.
35. Cassier P, Bénét T, Nicolle MC, Brunet M, Buron F, Morelon E, Béraud L, Descours G, Jarraud S, Vanhems P. Community-acquired Legionnaires' disease in a renal transplant recipient with unclear incubation period: the importance of molecular typing. **Transpl Infect Dis**. 2015 Oct;17(5):756-60.
36. Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebel C, Timsit JF, Schneider D, Maurin M. Hidden Selection of Bacterial Resistance to Fluoroquinolones In Vivo: The Case of *Legionella pneumophila* and Humans. **EBioMedicine**. 2015 Jul 17;2(9):1179-85.
37. F. Compain, P. Bruneval, S. Jarraud, S. Perrot, S. Aubert, V. Napoly, A. Ramahefasolo, J.-L. Mainardi, and I. Podglajen. Chronic endocarditis due to *Legionella anisa*: a first case difficult to diagnose. **New Microbes New Infect**. 2015 Nov; 8: 113–115.

2014

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

2013

43. Leclerc O, Fraisse PO, Labarraque G, Oster C, Pichaut JP, Baume M, Jarraud S, Fiscaro P, Vaslin-Reimann S. Method development for genomic *Legionella pneumophila* DNA quantification by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Anal Biochem** 2013;435:153-8.
44. Campese C, Jarraud S, Sommen C, Maine C, Che D. Legionnaires' disease in France: sensitivity of the mandatory notification has improved over the last decade. **Epidemiol Infect** 2013:1-6.
45. Baume M, Garrelly L, Facon JP, Bouton S, Fraisse PO, Yardin C, Reyrolle M, Jarraud S. The characterization and certification of a quantitative reference material for *Legionella* detection and quantification by qPCR. **J Appl Microbiol** 2013. Jun;114(6):1725-33.
46. Ghrairi T, Chaftar N, Jarraud S, Berjeaud JM, Hani K, Frere J. Diversity of *Legionellae* strains from Tunisian hot spring water. **Res Microbiol** 2013;164:342-50.
47. Jamilloux Y, Pierini R, Querenet M, Juruj C, Fauchais AL, Jauberteau MO, Jarraud S, Lina G, Etienne J, Roy CR, Henry T, Davoust N, Ader F. Inflammasome activation restricts *Legionella pneumophila* replication in primary microglial cells through flagellin detection. **Glia** 2013;61:539-49
48. Chaabna Z., Forey F., Reyrolle M., Jarraud S., Atlan D., Fontvieille D. Gilbert C, Molecular diversity and high virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from biofilms developed within a warm spring of a thermal spa. **BMC microbiology** 2013; doi : 10.1186/1471-2180-13-17
49. Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. **Methods Mol. Biol.** 2013; 954:119-48.
50. Jarraud S, Descours G, Ginevra C, Lina G, Etienne J. Identification of *Legionella* in clinical samples. **Methods Mol. Biol.** 2013; 954:27-56.
51. Descours G, Tellini C, Flamens C, Philit F, Celard M, Etienne J, Lina G, Jarraud S. Legionellosis and lung abscesses: contribution of *Legionella* quantitative real-time PCR to an adapted followup. **Case Rep Infect Dis.** 2013;2013:190183.
52. Den Boer JW, Euser SM, Nagelkerke NJ, Schuren F, Jarraud S, Etienne J. Prediction of the origin of French *Legionella pneumophila* strains using a mixed-genome microarray. **BMC Genomics.** 2013 Jul 1;14:435.
53. Cassier P, Landelle C, Reyrolle M, Nicolle MC, Slimani S, Etienne J, Vanhems P, Jarraud S. Hospital washbasin water: risk of *Legionella*-contaminated aerosol inhalation. **J Hosp Infect.** 2013; 85: 308-11
54. Beauté J, Zucs P, de Jong B, European Legionnaires' Disease Surveillance Network. Legionnaires' disease in Europe, 2009-2010. **Euro Surveill** 2013;18:20417.

Publication en tant qu'investigateur

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

2012

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

Les publications n° 1, 8, 17, 33, 44, 58, 61 ont été faites en collaboration avec SpF. Les publications n° 7, 5, 12, 25, 27, 29, 34, 54, 55 ont été faites en collaboration avec Ides membres du groupe européen ESGLI.

4.3 COMMUNICATIONS NATIONALES

2021

1. Ibranosyan M, Ginevra C, Simon B, Destras G, Regue H, Allam C, Beraud L, Bal A, Descours G, Josset L, Jarraud S. Characterisation of the lung virome in patients with Legionnaires' disease. 16ème congrès national de la **Société Française de Microbiologie (SFM)**, 22-24 septembre 2021, Nantes.

2019

2. Allam C, Testaert H, Ginevra C, Fessy N, Descours G, Beraud L, Guillemot J, Chapalain A, Argaud L, Conrad A, Lina G, Ader F, Jarraud S. Leukocyte anergy in patients with severe Legionnaires' Disease: a preliminary study. 39^{ème} **Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI)**, 16-17 décembre 2019, Paris.

2018

3. Couturier J*, Ginevra C, Nesa D, Adam M, Descours G, Campese C, Tankovic J, Beraud L, Ranc AG, Jarraud S, Barbut F. Description des deux premiers cas de légionellose nosocomiale transmis par l'eau des toilettes. 29^{ème} congrès de la **Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H)**, 6-8 Juin 2018, Montpellier.
4. Ana Elena Pérez Cobas*, Christophe Ginevra, Christophe Rusniok, Sophie Jarraud, Carmen Buchrieser. Dynamics of the lung microbiome during *Legionella*-associated pneumonia and antibiotic therapy. Modeling the Mammalian Microbiota Host Superorganism, Current Tools and Challenges, **Norecopa**, Paris, October 15-16, 2018.

2017

5. Carrillo G, Ginevra C, Jaboulay C, Jarraud S, Doublet P and Kay E. Evolution of virulence traits during mutation accumulation evolution experiment in *Legionella pneumophila*, **SFM**, Paris 9-11 octobre 2017

2016

6. S. Jarraud, G. Kapatai, S. David, C. Ginevra, J. Sweetman, M. Mentasti, R. Towolde, C. Campese, J. Etienne, A. Underwood, N. Fry, T. G. Harrison, V. Chalker. Investigation de l'épidémie de légionellose de Lens : apport du WGS. **RICAI** 2016, 13 Décembre 2016.

2015

7. Amandine Campan-Fournier, Christine Oger, Christophe Ginevra, Vincent Navratil, Anne-Gaëlle Ranc, Guy Perrière and Sophie Jarraud. Analysis of genomes from 32 strains of *Legionella pneumophila* of variable severity to identify determinants of pathogenicity. **Journées Ouvertes en Biologie Informatique et Mathématiques (JOBIM)**, Clermont-Ferrand, 6-9 juillet 2015
8. C. Massip, J.V. Reynaud, J. Charavit, P.A. Billy, I. Almahmoud, L. Béraud, A.G. Ranc, S. Boisset, M. Maurin, C. Ginevra, G. Lina, S. Jarraud, G. Descours. Distribution des CMI des souches de *Legionella pneumophila* résistantes et sensibles aux macrolides, aux fluoroquinolones ou à la rifampicine, communication orale, **RICAI** 2015, Décembre 2015

2014

9. Gérard Lina, 2ème journée du **GREPI**, table ronde Légionellose, Chantilly, les 4 et 5 décembre 2014

2013

10. Le Cann P*, Jarraud S., Robaldo G., Guégan J.-F., Pourcel C. Stabilité spatio-temporelle des souches de *L. pneumophila* dans l'environnement. Communication orale, **SympoLegio**, Lyon, 26- 27 novembre 2013.
11. Descours G*, Ginevra C, Forey F, Chastang J, Jacotin N, Etienne J, Lina G, Doublet P, Jarraud S. Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides. Communication orale, 33^{ème} **RICAI**, 21-22 Novembre 2013, Paris.
12. Descours G*, Ginevra C, Forey F, Chastang J, N. Jacotin, J. Etienne, G. Lina, S. Jarraud. Mécanismes de résistance des légionelles aux macrolides. **SympoLegio**, 26-27 Novembre 2013, Lyon.
13. P Cassier, C Ginevra, L Gomez-Valero, N Jacotin, C Buchrieser, S Jarraud and J Etienne. Specific real-time PCR for detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST47 in environmental samples. **SympoLegio** 2013, 26-27 Novembre 2013, Lyon

2012

14. Suivi de la cinétique des charges bactériennes par PCR en temps réel chez les patients atteints de légionellose. Shadoud L, Recule C, Pelloux I, Croizé J, Jarraud S, Timsit JF, Maurin M. Communication orale, **RICAI**, 23 Novembre 2012, Paris.
15. Prévention de légionellose nosocomiale, patients « à risque » : vers le risque nul ? Reyrolle M, Gardes S, Coudrais S, Droguet J, Lina G, Girard R, Jarraud S. Communication orale, **RICAI**, 23 Novembre 2012, Paris.

Les communications n° 3 et 6 ont été faites en collaboration avec SpF

2021

1. [Ibranosyan M](#), [Ginevra C](#), [Simon B](#), [Destras G](#), [Regue H](#), [Allam C](#), [Beraud L](#), [Bal A](#), [Descours G](#), [Josset L](#), [Jarraud S](#). Characterisation of the lung virome in patients with Legionnaires' disease. Poster présenté à l'oral à la 6th **International Conference on Clinical Metagenomics (ICCMg)**, 21-22 Octobre 2021, online.
2. [Ibranosyan M](#), [Ginevra C](#), [Destras G](#), [Regue H](#), [Allam C](#), [Beraud L](#), [Bal A](#), [Descours G](#), [Josset L](#), [Jarraud S](#). Characterisation of the lung virome in patients during Legionnaires' disease. **European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID)**, 9-12 Juillet 2021, online.

2020

3. [Lise Ursat](#), [Amélie Paccaud](#), [Anaëlle Bolon](#), [Joséphine Charavit](#), [Laetitia Beraud](#), [Camille Allam](#), [Christophe Ginevra](#), [Sophie Jarraud](#), [Ghislaine Descours](#). Evaluation de la technique UMIC pour l'antibiogramme de *Legionella pneumophila*, **RICAI 2020**, 14 et 15 Décembre distanciel.
4. [G. Thizy](#), [E. Lafont](#), [A. Scemla](#), [O. Roux](#), [S. Jarraud](#), [D. Lebeaux](#), [J. Pouchot](#), [F. Ader](#), [F. Lanternier](#). Légionellose en transplantation d'organe solide : étude rétrospective multicentrique sur 10 ans, **Journées Nationales d'Infectiologie (JNI)**, 9 – 11 Septembre 2020, Poitiers.

2019

5. [Beraud L](#), [Ltifi F](#), [Allam C](#), [Descours G](#), [Gaia V](#), [Jarraud S](#). Evaluation du test Standard F *Legionella* Ag FIA® SD Biosensor. 39ème **RICAI**, 16-17 Décembre 2019, Paris.
6. [Allam C](#), [Testaert H](#), [Ginevra C](#), [Fessy N](#), [Descours G](#), [Beraud L](#), [Guillemot J](#), [Chapalain A](#), [Argaud L](#), [Conrad A](#), [Lina G](#), [Ader F](#), [Jarraud S](#). Leukocyte inflammatory response in patients with severe Legionnaires' Disease: a preliminary study. *Microbes*, 15ème congrès national de la **SFM**, 30 Septembre – 2 Octobre 2019, Paris.
7. [Ibranosyan M](#), [Ginevra C](#), [Allam C](#), [Darien M](#), [Harou O](#), [Beraud L](#), [Ader F](#), [Descours G](#), [Bonnot PE](#), [Jarraud S](#). Confirmation du rôle de *Legionella pneumophila* sérotype 8 dans une fasciite nécrosante fatale par la technologie de séquençage MinION. *Microbes*. Poster présenté au 15ème congrès national de la **SFM**, 30 Septembre – 2 Octobre 2019, Paris.
8. [Ibranosyan M](#), [Allam C](#), [Darien M](#), [Harou O](#), [Beraud L](#), [Ginevra C](#), [Ader F](#), [Descours G](#), [Bonnet PE](#), [Jarraud S](#). Fatal necrotizing fasciitis due to *Legionella pneumophila* serogroup 8 around Sheldon hemodialysis catheter in an immunocompromised patient. **ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI)**, 10-12 Septembre 2019, Athènes, Grèce.
9. [Couturier J](#), [Barbut F](#), [Dhenin G](#), [Jolivet S](#), [Nesa D](#), [Boukari L](#), [Maison M](#), [Lapoussin S](#), [Descours G](#), [Salauze B](#). Un humidificateur d'air probablement à l'origine d'un cas de légionellose nosocomiale. 30ème congrès de la **SF2H**, 5-7 Juin 2019, Strasbourg.

2018

10. [Augey F](#), [Descours G](#), [Ranc AG](#), [Ginevra C](#), [Jarraud S](#), [Beraud L](#). Legiolert™, quantification de *Legionella pneumophila* dans l'eau potable. 38ème **RICAI** 17-18 Décembre 2018, Paris
11. [Wyndels K](#), [Descours G](#), [Capron A](#), [Heyman C](#), [Haeghebaert S](#), [Leduc G](#), [Parsy R](#), [Pruvost J](#), [Trouvain H](#), [Hochar AC](#), [Houdre N](#), [Tone A](#), [Ettahar N](#), [Pasquet A](#), [Jarraud S](#), [Campese C](#). Epidémie de fièvre de Pontiac : le rôle clé des prélèvements broncho-pulmonaires ! 38ème **RICAI**, 17-18 Décembre 2018, Paris
12. [Maud Baume](#), [Astrid Cariou](#), [Adelaide Leveau](#), [Noémie Fessy](#), [Frederic Pastori](#), [Sophie Jarraud](#), [Sophie Pierre](#). Quantification du matériau de référence certifié ADN de *Legionella* par digital droplet TM PCR (ddPCR). 38ème **RICAI**, 17 – 18 Décembre 2018 Paris

2017

13. [Botelho-Nevers Elisabeth](#), [Grattard Florence](#), [Viallon Alain](#), [Allegra Séverine](#), [Jarraud Sophie](#), [Paul Verhoeven](#), [Marcuccilli Adrien](#), [Lucht Frédéric](#), [Pozzetto Bruno](#), [Berthelot Philippe](#). Fréquence de la légionellose dans une cohorte prospective de patients hospitalisés pour pneumopathie infectieuse dans un CHU. 18ème **JNI**, St Malo, 21-23 Juin 2017
14. [Hennebique M](#), [Bidard S](#), [Jarraud L](#), [Beraud C](#), [Schwebel M](#), [Maurin S](#), [Boisset](#). Détection et quantification de la résistance aux fluoroquinolones chez *Legionella pneumophila* par PCR digitale. Poster commenté. 37ème **RICAI**, 18 – 19 Décembre Paris
15. [Ginevra C](#), [Nesa D](#), [Descours G](#), [Campese C](#), [Tankovic J](#), [Beraud L](#), [Ranc AG](#), [Jarraud S](#), [Barbut F](#). Légionellose chez les patients immunodéprimés : méfiez-vous des toilettes ! 37ème **RICAI**, 18-19 Décembre 2017, Paris.

16. Beraud L, Montoya A, Ranc AG, Descours G, Ginevra C, Lina G, Jarraud S. Apport du lecteur Alere™ pour la détection des antigènes *Legionella* urinaires. 37^{ème} **RICAI**, 18-19 Décembre 2017, Paris.

2016

17. A. Campan-Fournier, C. Ginevra, C. Oger, F. Jauffrit, A.G. Ranc, G. Perriere et S. Jarraud. Emergence d'un clone de *Legionella pneumophila* subsp. non-*pneumophila* ST701 . **JOBIM**, Lyon, 28-30 juin 2016
18. A. Souche, A-G. Ranc, G. Descours, C. Ginevra, G. Lina, S. Jarraud, L. Beraud. Evaluation de *Legionella* K-set®, test immunochromatographique pour le diagnostic de légionellose par détection d'antigénurie. **RICAI** 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.
19. L. Beraud, A.G. Ranc, R. Ruimy, C. Segonds, B. Podac, N. Aissa, E. Twizeyimana, I. Verdier, I. Vray, D. Fournier, C. Verdet, P. Lanotte, F. Mermet-Jeanvoine, P. Guiet, C. Ginevra, G. Lina, G. Descours*, S. Jarraud. Impact de la concentration des urines sur les performances du test BinaxNOW® *Legionella*. **RICAI** 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.
20. M. Mentasti, P. Cassier, S. David, C. Ginevra, L. Gomez-Valero, A. Underwood, B. Afshar, J. Etienne, J. Parkhill, V. Chalker, C. Buchrieser, T. Harrison, S. Jarraud. Rapid detection and evolutionary analysis of *Legionella pneumophila* ST47. **RICAI** 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.
21. H. Hanneltel, J-V. Reynaud, C. Kolenda, A-G. Ranc, L. Beraud, C. Campese, C. Ginevra, S. Jarraud, G. Descours. Apport de l'*Amoebae Plate Test* dans l'isolement de souches cliniques de *Legionella*. **RICAI** 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.
22. A-G. Ranc, S. Bidah, P. Courault, S. Mailler, I. Maffre, A. Miclot, R. Ottaviani, A. Bricout, C. Chavent, C. Vidal, C. Ginevra, L. Beraud, G. Descours, M. Welker, F. Vandenesch, G. Durand, V. Girard, S. Jarraud, O. Dauwalder. Typage des *Legionella pneumophila* séro groupe 1 par spectrométrie de masse. **RICAI** 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.
23. Impact de la concentration des urines sur les performances du test BinaxNow® *Legionella*. L. Beraud, A-G. Ranc, R. Ruimy, C. Segonds, B. Podac, N. Aissa, E. Twizeyimana, I. Verdier, I. Vray, D. Fournier, C. Verdet, P. Lanotte, F. Mermet-Jeanvoine, P. Guiet, C. Ginevra, G. Lina, G. Descours, S. Jarraud. **RICAI** 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.

2015

24. C. Massip, C. Gilbert, C. Ginevra, P. Doublet, S. Jarraud, G. Descours. Deux gènes de pompe à efflux associés à une résistance aux macrolides spécifique de clones de *Legionella pneumophila*, communication affichée, **RICAI** 2015, Décembre 2015
25. A.G. Ranc, C. Campese, L. Beraud, A. Lepoutre, G. Descours, C. Maine, C. Ginevra, G. Lina, S. Jarraud. Surveillance de la légionellose en France : retour des enquêtes épidémiologiques réalisées entre 2008 et 2014, communication affichée, **RICAI** 2015, Décembre 2015.
26. Amandine Campan-Fournier, Christine Oger, Christophe Ginevra, Vincent Navratil, Anne-Gaëlle Ranc, Guy Perrière and Sophie Jarraud. Analysis of genomes from 32 strains of *Legionella pneumophila* of variable severity to identify determinants of pathogenicity. **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
27. Amandine Campan-Fournier, Christophe Ginevra, Christine Oger, Frédéric Jauffrit, Anne-Gaëlle Ranc, Guy Perrière et Sophie Jarraud. Emergence d'un clone de *Legionella pneumophila* subsp. non-*pneumophila* ST701 ? **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
28. Laetitia Beraud. Surveillance de la Légionellose en France : retour des enquêtes épidémiologiques réalisées entre 2008 et 2014. **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
29. Rôle de 2 gènes codant une putative pompe à efflux dans la résistance aux macrolides de *Legionella pneumophila*. Clémence Massip. **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
30. Sophie Jarraud & Christophe Ginevra. Détection pulmonaire chronique de *Legionella* : échecs thérapeutiques, récidives ou réinfections ? **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
31. Olivier Challemel, Martine Adnane, Cécile Boudry, Anaïs Petit, Irene Maffre, Sophie Jarraud, Christine Lawrence, Françoise Enkiri et Damien Carlier. Identification par spectrophotométrie de masse Maldi - Tof (Brucker®) d'espèces de *Legionella*, autres que *Legionella pneumophila* isolées à Paris et dans sa banlieue limitrophe. **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
32. Dauwalder Olivier; Ottaviani Rehane; Maffre Irène; Miclot Alexandra; De Respinis Sophie; Monnin Valérie; mailler Sandrine; Welker Martin; Durand Géraldine; Gaia Valeria; Girard Victoria; Jarraud Sophie. Validation of the VITEK® MS IVD and RUO databases for *Legionella* species identification. **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
33. Christophe ginevra, Ghislaine Descours, Marine Vandewalle, Laetitia Beraud, Anne-Gaëlle Ranc, Gérard Lina and Sophie Jarraud. Complete Genome Sequences of 3 *Legionella pneumophila* isolates Using PacBio Single-Molecule Real-Time Sequencing Technology. **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015

34. Nathalie Jacotin, Christophe Ginevra, Laetitia Beraud, Ghislaine Descours and Sophie Jarraud. Hospital-acquired Legionnaires' disease cases confirmation using microbeads-based spoligotyping. **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
35. Massip C, Reynaud JV, Charavit J, Billy PA, Almahmoud I, Beraud L, Ranc AG, Boisset S, Maurin M, Ginevra C, Lina G, Jarraud S, Descours G. Distribution des CMI des souches de *Legionella pneumophila* résistantes et sensibles aux macrolides, aux fluoroquinolones ou à la rifampicine.. **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
36. Chefson-Girault C, Gourichon L., Pestel-Caron M., Thiberville L, Beraud L, Ranc A.G., Nouvellon M. *Legionella pneumophila* : Contamination massive de l'eau d'une unité de soins localisée uniquement sur les éléments périphériques du réseau. **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
37. Ranc Anne-Gaëlle, Carpentier Margot, Beraud Laetitia, Descours Ghislaine, Ginevra Christophe, Julien Verdon, Jean-Marc Berjeaud, Lina Gérard, Jarraud Sophie. Comparaison des limites de détection de 3 tests de détection d'antigène urinaire par l'utilisation de lipopolysaccharide extrait de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 à 15. **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015
38. Marine Vandewalle, Pierre-Alexandre Juan, Emilie Talagrand-Reboul, Gérard Lina, Patricia Doublet, Sophie Jarraud and Christophe Ginevra. Effect of human antimicrobial peptides against *Legionella pneumophila*. **SympoLegio** 2015, Lyon, 17-18 novembre 2015

2013

39. Freydière AM, Descours G, Vandenesch F, Lina G, Jarraud S. Evaluation du test immunochromatographique fluorescent Sofia Legionella FIA pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila*. Communication affichée, 33ème **RICAI**, 21-22 Novembre 2013, Paris.
40. Jacotin N, Descours G, Forey F, Chastang J, Etienne J, Lina G, Ginevra C, Jarraud S. Détection rapide de la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides par PCR en temps réel utilisant des sondes « sloppy molecular beacons », Communication affichée, 33ème **RICAI**, 21-22 Novembre 2013, Paris.
41. Le Cann P., Gérard A., Jarraud S., Loisy-Hamon F., Guégan J.F., Vergnaud G., Pourcel C. Stabilité spatio-temporelle des souches de *Legionella pneumophila* dans l'environnement. Communication affichée, 9^{ème} congrès de la **SFM**, Lille, 7-8 février 2013.

2012

42. Évaluation prospective de 4 milieux gélosés commerciaux pour l'isolement de *Legionella* à partir de prélèvements respiratoires. Descours G, Cassier P, Forey F, Etienne J, Lina G, Jarraud S. Communication affichée, **RICAI**, 23 Novembre 2012, Paris.
43. Nouvelle méthode de typage haut-débit de *Legionella pneumophila* appliquée aux dernières épidémies de légionellose dans le réseau d'eau chaude sanitaire de la ville de Rennes. Sobral D, Le Cann P, Gérard A, Jarraud S, Gardès J, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Vergnaud G, Pourcel C. Communication affichée, **RICAI**, 23 Novembre 2012, Paris.
44. Évaluation du réactif TRU *Legionella* (MERIDIAN) pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila*. Freydière AM, Descours G, Etienne J, Vandenesch F, Lina G, Jarraud S. Communication affichée, **RICAI**, 23 Novembre 2012, Paris.

Les communications n° 15, 21 et 25 ont été réalisées en collaboration avec SpF

4.4 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

Communications orales

2020

1. Allam C., Gaynard A., Descours G., Ginevra C., Josset L., Bouscambert M., Beraud L, Ibranosyan M., Golfier C., Friggeri A., COVID-19 diag HCL consortium, Lina B., Campese C., Ader,F., Jarraud S. Co-infection of *Legionella* and SARS-CoV-2 in France, March 2020 **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Conference on Coronavirus Disease (ECCVID)** sept 2020, online congress.

2019

2. Allam C, Testaert H, Ginevra C, Fessy N, Descours G, Beraud L, Guillemot J, Chapalain A, Argaud L, Conrad A, Lina G, Ader F, Jarraud S. Leukocyte anergy in patients with severe Legionnaires' Disease: a preliminary study. 6th **ESGLI** meeting, 10th-12th September 2019, Athens, Greece. Best presentation price.

2018

3. Ginevra C*, Beraud L, Ranc AG, Girardo P, Descours G, Jarraud S. *Legionella pneumophila* genotyping of French isolates: moving from SBT to cgMLST. 5th **ESGLI** Conference, August 28th-30th 2018, Lyon, France.
4. Wyndels K*, Capron A, Heyman C, Haeghebaert S, Leduc G, Parsy R, Pruvost J, Trouvain H, Hochar AC, Houdre N, Tone A, Ettahar N, Pasquet A, Descours G, Jarraud S, Christine Campese. An outbreak of Pontiac fever among workers in a potato-processing factory of the north of France. 5th **ESGLI** Conference, August 28th-30th 2018, Lyon, France.
5. Pérez Cobas AE*, Ginevra C, Rusniok C, Jarraud S, Buchrieser C. Evolution of the lung microbiome of *Legionella*-infected patients during long-term antibiotic treatment. Short talk. Challenges and new concepts in antibiotics research, 19th-21st march 2018, **Institut Pasteur** Paris.

2017

6. Dauwalder O, AG. Ranc, P. Courault, S. Bidah, S. Mailler, I. Maffre, A. Miclot, R. Ottaviani, A. Bricout, C. Chavent, M. Arzac, C. Vidal, C. Ginevra, L. Beraud, G. Descours, M. Welker, F. Vandenesch, G. Durand, V. Girard, S. Jarraud. Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: the MALDI-TOF mass spectrometry could be an efficient screening method. ePoster mini oral session, **ECCMID** Vienna 22-25 april 2017

2016

7. C. Pourcel*, G. Vergnaud, S. Jarraud, JF. Guegan, G. Robaldo, P. Le Cann. Spatio-temporal stability of *Legionella pneumophila* strains in drinking water networks. **International Symposium on Legionella**. Ecology, Virulence and Risk assessment, Braunschweig, Germany, 6-7 September 2016.
8. S. Jarraud*, G. Kapatai, S. David, C. Ginevra, M. Mentasti, J. Sweetman, R. Tewole, C. Campese, A. Underwood, N. Fry, V. Chalker, T.G. Harrison. Whole Genome Sequencing supports the role of waste-basin aeration as a direct source of Legionnaires' disease transmission during Lens outbreak. **ESGLI** congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
9. M. Mentasti, P. Cassier, S. David, C. Ginevra, L. Gomez-Valero, A. Underwood, B. Afshar, C. Buchrieser, J. Etienne, V. Chalker, T.G. Harrison, S. Jarraud. Molecular detection of a clinically important clone of *Legionella pneumophila* serogroup 1 – the "ST47 clone". **ESGLI** congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
10. L. Beraud*, A.G. Ranc, H. Lemaire, G. Descours, C. Ginevra, G. Lina, L. Barets, S. Jarraud. Case report: *Legionella bozemanii* arthritis caused by wound contamination. **ESGLI** congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
11. A.G. Ranc*, S. Bidah, S. Mailler, I. Maffre, A. Miclot, R. Ottaviani, A. Bricout, C. Chavent, M. Arzac, C. Vidal, P. Courault, C. Ginevra, L. Beraud, G. Descours, M. Welker, F. Vandenesch, G. Durand, O. Dauwalder, V. Girard, S. Jarraud. Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: the MALDI-TOF mass spectrometry could be an efficient screening method. **ESGLI** congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
12. S. David*, B. Afshar, M. Mentasti, C. Ginevra, I. Podglajen, S.R. Harris, S. Jarraud, T.G. Harrison, J. Parkhill. Genomic diversity and evolution of *Legionella pneumophila* "ST1" within hospitals and implications for future nosocomial investigations. **ESGLI** congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
13. H. Hanneltel, J.V. Reynaud, C. Kolenda, A.G. Ranc*, L. Beraud, C. Campese, C. Ginevra, S. Jarraud, G. Descours. Contribution of the Amoebae Plate Test (APT) to the isolation of *Legionella* spp. from clinical samples: prospective analysis over a period of 9 months. **ESGLI** congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.

2015

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

2014

17. Campese C*, Descours G, Poirier R, L'hospitalier J, Che D, Jarraud S. Nuclear plants: are they a source of exposure for cases of Legionnaires' disease? 2nd **ESGLI** congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
18. Rusniok C*, David S, Mentatsi M, Gomez-Valero L, Ginevra C, Underwood A, Jarraud S, Harrison T, Buchrieser

- C, Parkhill J. Whole genome sequencing identifies multiple independent recently emerged clones of *Legionella pneumophila*. 2nd **ESGLI** congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
19. Evgeni Tsvitsivadze, Tjeerd van der Ploeg, Nico J Nagelkerke, Jeroen W Den Boer, Sophie Jarraud, Carmen Pelaz, Maria L Ricci, Maria Scaturro, Stefano Fontana, Sjoerd M Euser, Jacob Bruin, Frank Schuren. Semi-supervised domain adaptation approach for development of microarray-based data prediction models of *L. pneumophila* strains. 2nd **ESGLI** congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014

2013

20. Rusniok C, Gomez-Valero L, Ginevra C, Ma L, Bouchier C, Jarraud S, Buchrieser C Population genomics and evolution of virulence of *Legionella*. Communication orale 10th **International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM-10)**. 02 October 2013 - 05 October 2013.
21. Campese C, Jarraud S, Forey F, Che D. Clusters of travel associated Legionnaires' disease in France; 2001-2012. Communication orale, 8th **International conference on Legionella**, Melbourne, Australie, 29 octobre-1er novembre 2013.
22. Le Cann P, Jarraud S, Robaldo G, Guégan J.-F, Pourcel C. Spatio-temporal stability of *Legionella pneumophila* strains in the environment. 8th **International conference on Legionella**, Melbourne, Australie, 29 octobre-1er novembre 2013.

2012

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

Les communications n° 4, 8, 13, 14, 17, 21, 26 ont été réalisées en collaboration avec SpF. Les communications n° 9 et 12 ont été réalisées en collaboration avec des membres du groupe européen ESGLI.

Communications affichées

2021

1. Allam C, Jugla T, Pinatel C, Del-Valle L, Beraud L, Descours G, Ginevra C, Sværke Jørgensen C, Ricci ML, Scaturro M, Lück C, Euser S, Michel C, Echahidi F, Kese D, Chalker V, Gaia V, Uldum SA, Jarraud S; **ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI)** Evaluation of 16 urinary antigens tests for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide subgroups. **ECCMID** online congress 2021

2020

2. Allam C, Fessy N, Ginevra C, Beraud L, Chastaing J, Descours G, Jarraud S. *Legionella pneumophila* qPCR in serum and respiratory samples as a marker of Legionnaires' disease severity. **ESCMID** congress, apr. 2020, Paris (Résumé accepté, congrès annulé)
3. Allam C, Ginevra C, Campese C, Beraud L, Prugne A, Morel D, Descours G, Jarraud S. *Legionella pneumophila* contamination from sleep apnea devices. A retrospective analysis of a 9 year incidence and the contribution of Whole Genome Sequencing. **ESCMID** congress, apr. 2020, Paris (Résumé accepté, congrès annulé)

2019

4. Ltifi F, Allam C, Descours G, Jarraud S, Beraud L. Evaluation of ImmuView® *L. pneumophila* and *L. longbeachae* antigen test. 6th **ESGLI meeting**, 10th-12th September 2019, Athens, Greece.

5. Ltifi F, Allam C, Descours G, Jarraud S, Gaia V, Beraud L. Evaluation of Standard F *Legionella* Ag FIA® test (SD Biosensor) for the detection of urinary *Legionella* antigens. 6th **ESGLI** meeting, 10th-12th September 2019, Athens, Greece.
6. Ibranosyan I, Allam C, Darien M, Harou O, Beraud L, Ginevra C, Ader F, Descours G, Bonnot PE, Jarraud S. Fatal necrotizing fasciitis due to *Legionella pneumophila* serogroup 8 around Sheldon hemodialysis catheter in an immunocompromised patient. 6th **ESGLI** meeting, 10th-12th September 2019, Athens, Greece.
7. Ltifi F, Beraud L, Allam C, Descours G, Ginevra C, Jarraud S. Evaluation of the supplement Free DNA Removal Solution (FDRS) step in the Bio-Rad iQ-Check *Legionella* PCR method on sanitary hot water samples. 6th **ESGLI** meeting, 10th-12th September 2019, Athens, Greece.
8. Allam C, Descours G, Chaverot L, Chastang J, Dumitrescu O, Laurent F, Rodriguez Nava V, Jarraud S. Amoebae Plate Test (APT) as a new effective tool for *Nocardia* isolation. 29th **ECCMID**, April 13th-16th 2019, Amsterdam, The Netherlands.
9. Testaert H., Allam C., Ginevra C., Fessy N., Bernard C., Guillemot J., Chapalain A., Argaud L., Lina G., Ader F., Jarraud S. Leukocyte anergy in patients with severe Legionnaires' disease. **ECCMID** 2019, 13 – 16 April, Amsterdam 2019
10. Daniël Leenheer, Pelaz Pelaz, Matilda Morin, Daniela Klingenberg, Sophie Jarraud, Christophe Ginevra, Lionel Guy. Rapid adaptations to the human host in *Legionella pneumophila*. **SMBE** 2019, 21-25 Juillet 2019 UK

2018

11. Augey F, Descours G, Ranc AG, Ginevra C, Jarraud S, Beraud L. Evaluation of Legiolert™, a most probable number method for the enumeration of *Legionella pneumophila* from potable water samples. 5th **ESGLI** Conference, August 28th-30th 2018, Lyon, France.
12. Pouderoux C, Descours G, Ranc AG, Beraud L, Ginevra C, Bruillard P, Bergeron-Lafaurie A, Jarraud S, Ader F. Persistent Legionnaires' Disease: series of 12 cases and review of the literature. 5th **ESGLI** Conference, August 28th-30th 2018, Lyon, France.
13. Ginevra C, Beraud L, Descours G, Ranc AG, Girardo P, Jarraud S. *Legionella* direct detection and identification using 16S MinION sequencing. 5th **ESGLI** Conference, August 28th-30th 2018, Lyon, France. 5th **ESGLI** Conference, August 28th-30th 2018, Lyon, France.
14. Ginevra C, Beraud L, Descours G, Ranc AG, Girardo P, Jarraud S. *Legionella pneumophila* subspecies *raphaeli* prevalence in France: the far side of the moon. 5th **ESGLI** Conference, August 28th-30th 2018, Lyon, France.
15. Campese C, Beraud L, Descours G, Ranc AG, Girardo P, Ginevra C, Jarraud S. Legionnaires' disease surveillance in France, 2008-2018 : should we improve the surveillance of domestic water systems ? 5th **ESGLI** Conference, August 28th-30th 2018, Lyon, France.
16. Baume M, Cariou A, Leveau A, Fessy N, Pastori F, Jarraud S, Pierre S. Quantification of *Legionella* DNA Certified Reference Material (CRM) by digital droplet PCR (ddPCR). 5th **ESGLI** Conference, August 28th-30th 2018, Lyon, France.
17. Cyril Rousseau, Christophe Ginevra, Leslie Banzet, Noël Fiard, Anne Gaëlle Ranc, Karine Vilhès, Hervé Gornès, Sophie Jarraud, Damien Mouly, Christine Campese. An unusual long-lasting community outbreak of legionnaires' disease linked to an aquatic therapy center in Montpellier, France, 2017. 5th **ESGLI** Conference, August 28th-30th 2018, Lyon, France.
18. Souami KY, Taghight-Mah S, Uldum S, Petersen RF, Jarraud S, Tizarouine O, Haddadi DT, Boudjemline N, Guettouche SM, Ammari H, Yala D, Ghaffor M. *Legionella pneumophila* at Mitidja area (Algiers and neighbourhood), Algeria. 5th **ESGLI** Conference, August 28th-30th 2018, Lyon, France.

2017

19. Beraud L, Montoya A, Ranc AG, Descours G, Ginevra C, Lina G, Jarraud S. Performance of the BinaxNOW® *Legionella* Urinary Antigen rapid test in conjunction with the Alere™ Reader. 9th **International Conference on Legionella**, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.
20. Ginevra C, Nesa D, Descours G, Campese C, Tankovic J, Beraud L, Ranc AG, Jarraud S, Barbut F. Legionnaires' disease in immunocompromised patients: beware of toilets! 9th **International Conference on Legionella**, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.
21. Ginevra C, Chastang C, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, and Moran-Gilad J. Specific real-time PCR for detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1. 9th **International Conference on Legionella**, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.
22. Carrillo G., Ginevra C., Jaboulay C., Doublet P., Jarraud S., Kay E. Evolution of virulence traits during mutation accumulation evolution experiment in *Legionella pneumophila*. 9th **International Conference on Legionella**, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.

23. Vandewalle M., Guillemot J., Chapalain A., Lina G., Doublet P., Jarraud S., Ginevra C. Effect of human antimicrobial peptides against *Legionella pneumophila*. 9th **International Conference on Legionella**, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.
24. Leenheer D., Pelaz C., Morin M., Hallin E., Klingsberg D., Jarraud S., Ginevra C. Rapid adaptations to the accidental human host in *Legionella pneumophila*. 9th **International Conference on Legionella**, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.
25. Ginevra C., Chastang C., David S., Mentasti M., Yakunin E., Chalker V.J., Chalifa-Caspi V., Valinsky L., Jarraud S., Moran-Gilad J. Specific real-time PCR for detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1. 9th **International Conference on Legionella**, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.
26. L. Gomez-valero, C. Rusniok, G. Schroeder, D. Carson, S. Mondino, A.E. Perez-cobas, M. Rolando, S. Reuter, J. Dermatas, J. Crumbach, S. Descorps-declere, G. Frankel, S. Jarraud, E. Hartland, C. Buchrieser. The *Legionella* genus genome: a global view of the genus evolution. **FEMS** 11-13 Juillet 2017, Valencia, Espagne.
27. Ana Elena Pérez-Cobas, Christophe Ginevra, Christophe Rusniok, Sophie Jarraud, Carmen Buchrieser. Lung microbiome composition during Legionella-associated pneumonia and antibiotic treatment, **IBPS International Symposium on Symbiosis** short talk, 15-17 mars 2017, Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris France.
28. Ana Elena Pérez-Cobas, Christophe Ginevra, Christophe Rusniok, Sophie Jarraud, Carmen Buchrieser. Characterization of the lung microbiome in *Legionella*-associated pneumonia and its evolution during antibiotic treatment. **FEMS** 11-13 Juillet 2017, Valencia, Espagne Poster Discussion Sessions.

2016

29. O. Dauwalder*, A.G Ranc, P. Courault, S. Bidah, S. Mailler, I. Maffre, A. Miclot, R. Ottaviani, A. Bricout, C. Chavent, M. Arzac, C. Vidal, C. Ginevra, L. Beraud, G. Descours, M. Welker, F. Vandenesch, G. Durand, V. Girard, S. Jarraud. Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: the MALDI-TOF mass spectrometry could be an efficient screening method. **ECCMID**, Amsterdam, Hollande, 9-12 April 2016.
30. A. Campan-Fournier, C. Ginevra, C. Oger, F. Jauffrit, V. Navratil, A.G. Ranc, G. Perriere, S. Jarraud. Emergence of a *Legionella pneumophila* subsp. *non-pneumophila* ST701 clone. **ESGLI** congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
31. C. Ginevra, B. Garin, A.E. Perez Cobas, D. Dervins-Ravault, M. Wouafo, K.S. Lay, S. Jarraud, C. Buchrieser. First survey and identification of *Legionella pneumophila* in tropical countries: environmental isolates from Cameroon, Cambodia and Senegal. **ESGLI** congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
32. L. Beraud*, A.G. Ranc, R. Ruimy, C. Segonds, C. Ginevra, G. Lina, G. Descours, S. Jarraud. Impact of urine samples concentration on Legionnaires' disease diagnosis with BinaxNOW® *Legionella* urinary test: a prospective study. **ESGLI** congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
33. A. Souche, A.G. Ranc, G. Descours, C. Ginevra, G. Lina, S. Jarraud, L. Beraud*. Evaluation of legionella K-set®, a lateral flow test for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigens in urine samples. **ESGLI** congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
34. C. Ginevra*, J. Chastang, C. Massip, G. Descours, C. Gilbert, S. Jarraud. Clonal distribution of *Legionella pneumophila* macrolides specific efflux pump. **ESGLI** congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
35. M. Petzold, S. Jarraud, R. Ehricht, N. Jacotin, T. Meyer, P. Slickers, A. Ziegler, S. Monecke, C. Lück. LegioType AS-1: Rapid microarray-based genotyping of *Legionella pneumophila* Sg1 isolates, 4th ESGLI Conference, Amsterdam 22-23 September 2016.

2015

36. Ranc Anne-Gaëlle, Carpentier Margot, Beraud Laetitia, Descours Ghislaine, Ginevra Christophe, Lina Gérard, Jarraud Sophie. Comparison of the detection limits of urinary antigen tests using extracted *Legionella pneumophila* serogroup 1 to 15 lipopolysaccharide. Communication affichée, **ESGLI** Meeting, London, UK, september 2015
37. Christophe Ginevra, Ghislaine Descours, Marine Vandewalle, Laetitia Beraud, Anne-Gaëlle Ranc, Gérard Lina and Sophie Jarraud. Complete Genome Sequences of 3 *Legionella pneumophila* isolates Using PacBio Single-Molecule Real-Time Sequencing Technology. Communication affichée, **ESGLI** Meeting, London, UK, september 2015
38. Dauwalder Olivier, Ottaviani, Rehane, Maffre Irène, Miclot Alexandra, De Respinis Sophie, Monnin Valérie, Mailler Sandrine, Welker Martin, Durand Géraldine, Gaia Valeria, Girard Victoria, Jarraud Sophie. Validation of the VITEK®MS IVD and RUO databases for *Legionella* species identification. Communication affichée, **ESGLI** Meeting,

2014

39. Jacotin N, Ginevra C, Beraud L, Descours G, Jarraud S. Hospital-acquired Legionnaires' disease cases confirmation using microbeads-based spoligotyping. 2nd **ESGLI** congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
40. Beraud L, Maccio G, Vernet N, Descours G, Jarraud S, Freydière AM. Evaluation of the bioNexia[®] *Legionella* in comparison with the BinaxNOW[®] *Legionella* urinary antigen card : preliminary results. 2nd **ESGLI** congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
41. Freydière AM, Gervasoni K, Descours G, Vandenesch F, Lina G, Gaia V, Jarraud S. Evaluation of the Sofia *Legionella* FIA in comparison with the BinaxNOW[®] *Legionella* Urinary Antigen Card in two centers. 24th **ECCMID**, Barcelone, Espagne, 10-13 juin 2014
42. Lück C, Jarraud S, Ehricht R, Engelmann I, Jacotin N, Meyer T, Petzold M, Slickers P, Ziegler A and Monecke S. Microarray-based strain assignment of *Legionella pneumophila* isolates. 24th **ECCMID**, Barcelone, Espagne, 10-13 juin 2014
43. Descours G, Jacotin N, Forey F, Chastang J, Etienne J, Lina G, Ginevra C, Jarraud S. Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: from molecular characterization to clinical investigations. 24th **ECCMID**, Barcelone, Espagne, 10-13 juin 2014
44. Cassier P, Campese C, Le Strat Y, Che D, Jarraud S. Association between ST1 clone of *Legionella pneumophila* and hospital exposure: what's the trigger? 24th **ECCMID**, Barcelone, Espagne, 10-13 juin 2014
45. C. Rusniok, S. David, M. Mentasti, L. Gomez-Valero, S. Harris, C. Ginevra, A. Underwood, S. Jarraud, T. Harrisson, C. Buchrieser, J. Parkhill. Whole genome sequencing identifies recently emerged clones of *Legionella pneumophila*. Microbiology after the genomics révolution: **Genomes** 2014, Institut Pasteur, Paris, France, 24-27 juin 2014
46. E. Kay, T. Sahr, C. Ginevra, C. Andrea, J. allombert, C. Gilbert, D. Schneider, P. Doublet, C. Buchrieser. Global transcriptional control of metabolism and virulence by nucleoid-associated proteins in *Legionella pneumophila*. Microbiology after the genomics révolution: **Genomes** 2014, Institut Pasteur, Paris, France, 24-27 juin 2014.

2013

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

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

Les communications n° 1, 15, 17, 20, 44, 57 ont été réalisées en collaboration avec SpF. Les communications n° 21 et 25 ont été réalisées en collaboration avec le groupe européen ESGLI.

4.5 CONFERENCES SUR INVITATIONS

Nationale

2021

1. Jarraud S. Webinar One health SFM, Environnement et pathogènes : des liaisons dangereuses ? Impact de l'environnement sur la pathogénicité de *Legionella*. **Webinar** organisé par la section Microbiologie environnementale de la **SFM**, 25 mars 2021
2. Jarraud S. Webinar de la SFM Le Remic's, *Legionella* spp. 3 Juin 2021
3. Jarraud S. La légionelle dans tous ses états - Épidémiologie et résistance, **Congrès SF2H**, Nantes 4 – 6 Octobre 2021

2020

4. Jarraud S. Etat des lieux sur la légionellose, épidémiologie et prise en charge. 8èmes journées du **GREPI**, 26-27 Novembre 2020

2018

5. Jarraud S. Intervention – table ronde. Conférence **GIRPI** sur « Les réseaux d'eau chaude et d'eau froide sanitaire. De la conception, réalisation à l'exploitation ».

2017

6. Jarraud S*. La légionellose en France aujourd'hui. **Journée régionale de formation sur Risque infectieux lié à l'environnement en ES, EMS et en ville**, 10 octobre 2017, Tours (35 min)

2014

7. Descours G. Detecting *Legionella* in environmental and clinical samples. A critical review of the current methods. 2nd **ESGLI** congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014.

2013

8. Descours G*, Jarraud S. Formation médicale continue « Les dix erreurs à ne pas faire dans le diagnostic des légionelloses ». 33^{ème} **RICAI**, 21-22 Novembre 2013, Paris.

2012

9. S. Jarraud. *Legionella* sp : que faisons-nous ? Que faut-il oublier ? Le point de vue du microbiologiste. Communication orale, **RICAI**, 23 Novembre 2012, Paris.

Internationale

2021

1. Jarraud S. Legionella and SARS-Cov-2 co-infection in France in 2020, ESGLI Webinar 2021 on the Legionella during the COVID Pandemic, 23 June 2021
2. Jarraud S. Current surveillance trends LD – Europe 2019-2020. Experience 2020: France, Digital Webex Conference, Business Meeting of the European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet), 9 Juin 2021

2019

3. Descours G. « Antimicrobial resistance in Legionella », 6th **ESGLI** meeting, 10th-12th September 2019, Athens, Greece.

4. Jarraud S. *Legionella* bacteria surveillance in France and Europe. 5th session meeting of the parties to the protocol on water and health, **UNECE** meetings, 19-21 Nov 2019, Belgrade, Serbie. High-level intergovernmental meeting on advancing the water, sanitation and health agenda in the panEuropean region, in support of implementing the 2030 Agenda for Sustainable Development.

2018

5. Jarraud S. « Molecular detection and typing of *Legionella* infections » in session News advances in the molecular detection of atypical agents of respiratory tracts infections, 28th **ECCMID**, 21st – 24th April 2018, Madrid, Spain.
6. Jarraud S. « Environmental detection of *Legionella* and molecular identification of contamination sources ». 2nd **International Congress of Environmental Science and Technology – ICES** 2018, Hammamet, Tunisie, 3-5 Mai 2018.
7. Ginevra C. « *Legionella pneumophila* typing: from Sequenced-based typing to whole genome sequencing ». **European Legionnaires' disease surveillance network (ELDSNet)** meeting Lyon, France, 27-28 Août 2018.

2017

8. Jarraud S*, Diagnosis and *Legionella* typing of atypical forms of legionellosis, **International congress Legionella** 2017, 26-30 September 2017, Rome, Italie (30 min)

2016

9. Jarraud S*, State of the art regarding Whole Genome Sequencing (WGS) 7th meeting of the **ELDSNet**, 20-21 september 2016, Amsterdam, The Netherlands (45 min).
10. Jarraud S*, Investigations of a large *Legionella* outbreak in Lens, France, by Whole Genome Sequencing. **Legionella symposium : Legionella (1976 to 2016) – from whole guinea pigs to whole genome sequencing**, 31 mars 2016, Public Health England, London, England (30 min).
11. Jarraud S*, Investigations of a large *Legionella* outbreak in Lens, France, by Whole Genome Sequencing. 7 April 2016, **Wellcome Trust Sanger Institute**, Cambridge, England (30 min).

2014

12. Gérard Lina 2^{èmes} journées du **GREPI**, table ronde Légionellose, Chantilly, les 4 et 5 décembre 2014
13. Jarraud S*. Les légionelloses à *Legionella* non Lp1 ; les mécanismes de résistance et les moyens de dépister la résistance aux antibiotiques, **séminaire hôpital Bichat**, 6 Juin 2014.

2013

14. Jarraud S*. Can surveillance and control of legionellosis rely on antigen / DNA detection methods ? **ECCMID**, Berlin, Germany 27-30 April 2013
15. Jarraud S*. Evaluation du risque lié aux légionelles. **Congrès International de la Bio-Surveillance de l'environnement**, Casablanca, Maroc, 24-26 Octobre 2013
16. Jarraud S*, Descours G, Ginevra C, Cassier P, Lina G, Etienne J. Detection of *Legionella* in clinical samples, still in need of improvement. **Legionella** 2013, 29 octobre – 1^{er} novembre 2013, Melbourne, Australie.

2012

17. S. Jarraud. Impact de la surveillance des cas de légionellose sur la compréhension de la maladie, **Colloque international organisé par l'association ECOMICTH et l'AAMHA**. La gestion de la qualité de l'eau (réseaux et thermalisme). Sousse 21 au 23 mai 2012

4.6 OUVRAGE OU CHAPITRE D'OUVRAGE

Chapitre d'ouvrage en langue française

1. « *Legionella pneumophila* ». G Descours et S. Romano-Bertrand. Collection Objectif Internat Pharmacie. Ed. Elsevier Masson; Sous presse
2. S. Jarraud et J. Etienne. Legionella, une bactérie naturelle de l'environnement hydrique, responsable de la légionellose, une maladie de la modernité in Le défi des maladies infectieuses Des pestes à la COVID-19, Sous la direction de P. Cramer et A. Meigien, Les Edition du Palais, Edition Docis, Nov 2020
3. G Descours, AG Ranc, L Beraud, G Lina, S Jarraud. Chapitre 89, *Legionella* et légionellose. 3^{ème} édition Précis de bactériologie clinique, Editions ESKA, 2016.
4. AG Ranc, L Beraud, G Descours, G Lina, S Jarraud. Chapitre *Legionella*, 3^{ème} édition Bactériologie médicale : techniques usuelles, Editions Masson Elsevier, 2016.

5. Legionella 4ème REMIC 2014

Chapitre d'ouvrage en langue anglaise

6. NK Fry, S Jarraud. Epidemiological genotyping of *Legionella pneumophila*: from plasmids to sequence-based typing. Editing in *Legionella in the Genomic Era*, Jacob Moran-Gilad and Caster Press Editors, 2020
7. Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. *Methods Mol. Biol.* **2013**; 954:119-48.
8. Jarraud S, Descours G, Ginevra C, Lina G, Etienne J. Identification of *Legionella* in clinical samples. *Methods Mol. Biol.* **2013**; 954:27-56.
9. Ginevra C. "Molecular typing of *Legionella*" du livre "Molecular typing of bacteria" (édition Humana press), **2012**
10. Jarraud S. Free-living Amoebae : An Evolutionary Crib for Emerging Pathogens, Wiley-Blackwell Editors G. Greub, Chapter 5: *L. pneumophila* and Legionnaires' disease: epidemiology, clinical presentation, diagnostic and treatment, 2012

5 DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITE ET GARANTIES MISES EN ŒUVRE AU SEIN DU LABORATOIRE

5.1 ACCREDITATION

Le laboratoire de biologie médicale des Hospices Civils de Lyon est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 (accréditation COFRAC n°8-3442) et le même système de management de la qualité est appliqué à tous les services du laboratoire. Le CNR des Légionelles est accrédité pour la recherche de *Legionella* dans les prélèvements respiratoires par PCR (ligne BA02, 2 PCR accréditées depuis janvier 2017 et octobre 2020) et par culture depuis octobre 2020 (ligne MG11), la recherche d'antigénurie *Legionella* depuis avril 2019 (ligne MG03) et la sérologie par technique ELISA depuis octobre 2019 (ligne MG01). La sérologie par IF a fait l'objet d'une demande d'extension validée en janvier 2022 (ligne MG01 portée B). Le typage des souches de *Legionella*, détermination du Sequence-Type, par NGS fera l'objet d'une demande d'ajout (ligne MG06) en avril 2022.

De plus, le CNR est accrédité pour la détection des *Legionella* dans les eaux propres par culture et PCR selon la norme NF EN ISO 17025 depuis juillet 2012 (accréditation COFRAC n°1-2423).

5.2 STRUCTURE QUALITE DU LABORATOIRE

La démarche qualité est gérée au niveau du pôle d'activité par une cellule qualité centrale que dirige le responsable qualité du laboratoire de biologie médicale. Le système qualité est articulé autour des processus dits de « pilotage », de « réalisation » et « supports », pour chacun desquels il existe un pilote et des participants au groupe de travail permettant de gérer et d'améliorer le processus (Figure 34).

Cartographie des processus du LBMMS

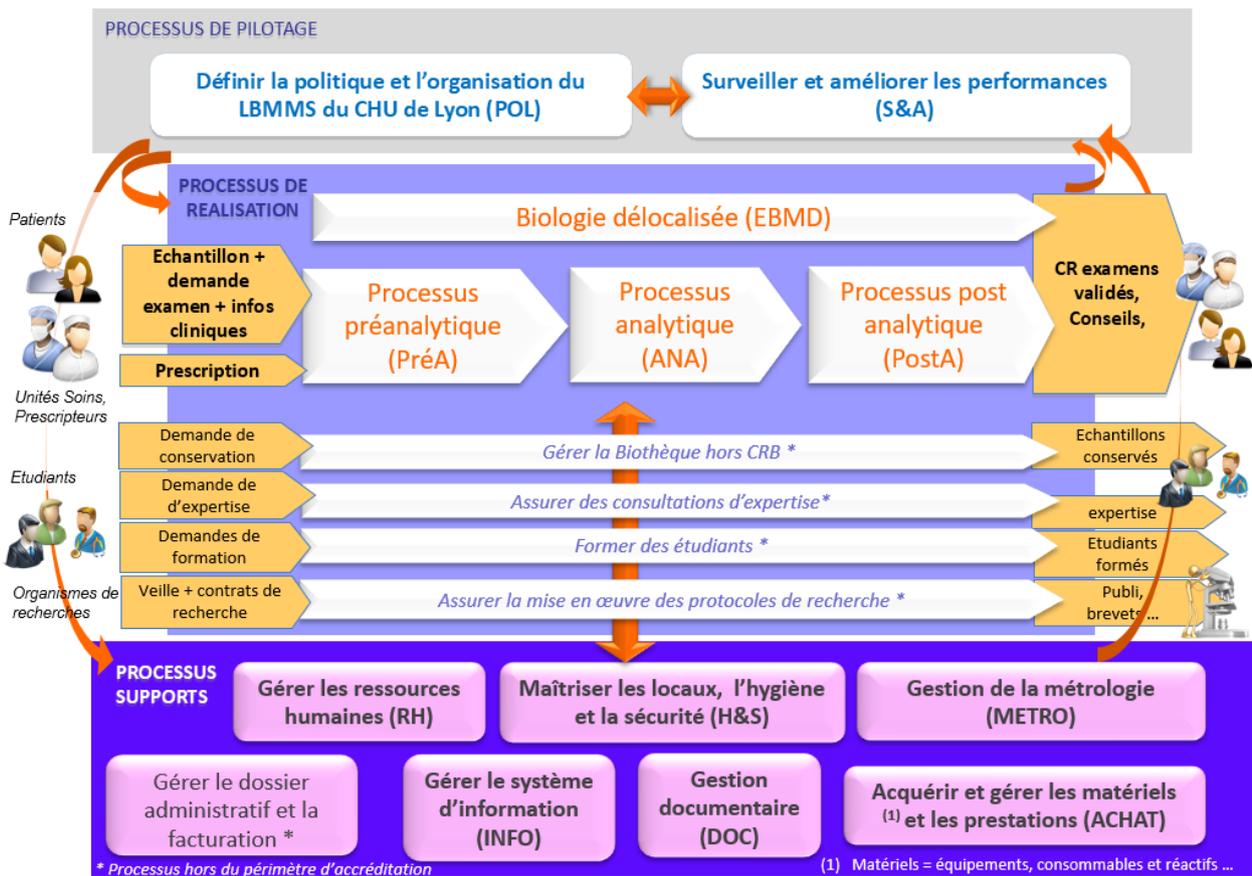


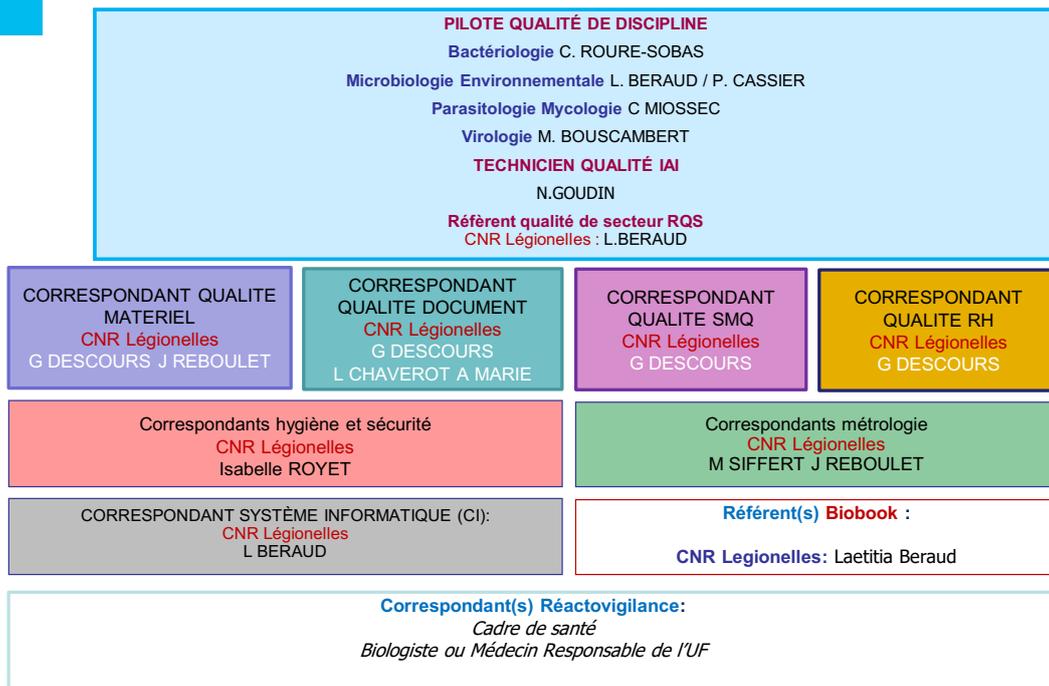
Figure 34 : Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001-03)

Chaque service du laboratoire a également nommé un référent qualité qui déploie la démarche dans son secteur. Pour le CNR des Légionelles, il s'agit de Laetitia Beraud.

La figure 35 représente un extrait de l'organigramme qualité du laboratoire de l'Institut des Agents Infectieux (valide au 03 janvier 2022).

Un manuel qualité est disponible qui détaille l'ensemble des politiques et procédures mises en place pour répondre aux exigences d'accréditation de la biologie médicale.

Fonctions qualité et support du Service IAI



11

NE-RH-DE-012-14

RQS correspond au Réfèrent Qualité de Site dans Kallibab, ici appliqué aux secteurs de l'IAI

Figure 35 : Extrait de Organigramme qualité du laboratoire de l'institut des Agents Infectieux.

5.3 EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE (EEQ)

Le CNR participe à des campagnes d'EEQ pour l'ensemble de ses techniques accréditées. Les 3 techniques d'antigénurie *Legionella* sont suivies par les EEQ Aglae (3 échantillons, 2 fois par an) depuis 2019. Cet EEQ présente l'avantage de fournir un volume suffisant d'urines pour tester les 3 méthodes dans différentes conditions, notamment sur urines concentrées pour les tests acceptant ce pré-traitement. De 2017 à 2020, les techniques d'antigénurie étaient suivies grâce aux EEQ LabQuality. Les techniques de sérologies sont suivies depuis 2019 grâce à l'EEQ RCPAQAP revendu par Eurobio (2 échantillons, 2 fois par an). La mise en place d'EIL (Echange Inter Laboratoire) avec des CNR d'autres pays européens pour ces techniques d'expertise serait souhaitable mais n'existe pas encore bien que des premiers contacts avec le Danemark, la Suisse et la Norvège montrent sa faisabilité. Après un essai encouragé par l'ECDC en 2015, QCMD est utilisé pour le suivi des PCR *Legionella* depuis 2017 (10 échantillons, 1 fois par an). Ces échantillons permettent un suivi de nos 3 techniques de PCR (Diagenode ciblant L.spp et Lp, ESGLI ciblant Lp et Lp1 et la PCR Lp1 maison), ainsi que du typage directement sur prélèvement par 23s-5s et par nested-SBT. Enfin, depuis 2019, le CNR participe à un EEQ promu par l'ECDC réalisé 2 fois par an et simulant une enquête environnementale. Dans le cadre de ce programme, le CNR reçoit des prélèvements (urines et respiratoires) de 10 supposés patients et 10 échantillons environnementaux. Ces échantillons permettent un contrôle des techniques d'antigénurie, de PCR et de culture puis la comparaison des souches isolées des prélèvements respiratoires et environnementaux permet un suivi des techniques de typage (Sequence Type, cgMLST et phylogénie).

Pour le suivi de ses techniques sur prélèvements d'eau, le CNR participe depuis 2009 à l'EEQ recherche de *Legionella* par PCR d'Aglae (2 échantillons 2 fois par an) et depuis 2010 à l'EEQ recherche de *Legionella* dans les eaux propres en culture de PHE (2 échantillons 4 fois par an).

5.4 AUDITS

Dans le cadre de l'accréditation, le CNR des légionelles est audité depuis 2012 par des évaluateurs COFRAC sur la norme 17025 et depuis 2017 sur la norme 15189. Ces audits ont toujours mis en avant la compétence des personnels du CNR

et leur participation active dans la démarche qualité. Les évaluateurs ont à chaque fois accordée leur confiance au CNR et leurs rapports ont permis le maintien de l'accréditation (dernier audit 15189 effectué en janvier 2022 pour l'extension de la sérologie par IF et en mars 2021 sur la norme 17025).

De plus, des audits internes ont lieu régulièrement, pour vérifier le respect et le suivi des exigences, selon la norme 17025 et selon la norme 15189. Ils sont réalisés par du personnel du laboratoire ou de laboratoires extérieurs formé à l'audit et donnent lieu à des rapports qui nous permettent de mettre en place des actions d'amélioration. Le dernier audit interne 17025 réalisé en novembre 2021 s'est particulièrement intéressé à l'étude d'impact de la révision 04 du LAB GTA 23.

5.5 LOGICIEL DE GESTION DE LA QUALITE

Le laboratoire dispose d'un logiciel de gestion de la qualité (Kalilab®, Netika) permettant (i) de gérer la documentation (205 documents qualité gérés pour le CNR des Légionelles), (ii) de suivre les compétences du personnel (formations, évaluations et qualifications), (iii) de gérer le matériel et ses maintenances.

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

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

5.6 AVANCEMENT DE LA DEMARCHE

L'objectif du CNR est de maintenir l'accréditation sur l'ensemble des analyses déjà accréditées et de respecter l'engagement d'accréditer à *minima* une analyse représentative par ligne de portée. Cette exigence sera respectée dès avril 2022 avec la demande d'ajout de la technique de typage Sequence-Type de souche par NGS, représentative de la ligne MG06 à l'accréditation.

Le suivi d'accréditation des autres techniques est réalisé annuellement lors de la revue des méthodes. En cas de changement d'une portée flexible, une information au COFRAC est réalisée. Ceci a notamment été le cas en 2017 lors du déménagement vers l'IAI et en 2021 lors d'un changement d'extracteur impliqué dans les techniques de PCR sur prélèvement. En 2022, 2023, Le CNR prévoit de changer ses techniques de PCR diagnostics, changement de kit commercialisé et/ou changement de thermocycleur. L'accréditation sera maintenue pour la nouvelle PCR choisie.

Enfin, un déménagement de la plateforme de séquençage est prévu en 2023 et une attention particulière sera portée afin de maintenir l'accréditation des techniques de typage.

L'accréditation de nouvelles techniques, comprenant des techniques de NGS (typage par cg-MLST, analyses phylogénétiques, recherche de résistance aux antibiotiques) et la réalisation d'antibiogramme par CMI en milieu liquide, sera au programme du prochain mandat.

6 DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

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

La transmission des données auprès de Santé Publique France et de ses correspondants peut revêtir deux formes distinctes :

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

- pour la transmission de données non anonymisées, les biologistes du CNR possèdent tous une adresse sécurisée de santé via MonSisra

- la transmission de données associées à un ou plusieurs patients. Le CNR, en lien avec la Direction du Système d'Information (DSII) des HCL met en place un système de transmission sécurisée dans le cadre du projet de Télémédecine développé par la DSII pour la Direction Générale des HCL. Ce système permet un rendu en temps réel aux prescripteurs des résultats, avis spécialisés du CNR et conseils sur un serveur sécurisé « HYBRID » qui assure ainsi la sécurité et la traçabilité des résultats. Ce serveur de résultats spécifique (HYBRID) est disponible pour tous les établissements extérieurs. L'accès au serveur de résultats HYBRID peut être demandé auprès du service clientèle joignable par mail à l'adresse suivante : relationclient.lbmms@chu-lyon.fr. Ce serveur ne se substituera pas aux moyens de communication direct (téléphone) ni au site internet du CNR (<https://cnr-legionelles.univ-lyon1.fr>).

Par ailleurs, nous avons mis en œuvre depuis plusieurs années une transmission régulière et informatisée de données vers SpF selon un fichier excel anonymisé. En 2020, le système d'échange de fichiers Excel entre le CNR et SpF a évolué pour assurer la sécurité des données en utilisant la plateforme disponible sur le site de SpF : <https://partage.santepubliquefrance.fr/file>

7 PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2023-2027

Rappel du cahier des charges pour le CNR *Legionella*

1. Expertise

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

2. Conseil

- en contribuant aux expertises nationales et européennes.

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

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

4. Contribution à l'alerte

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

7.1 ACTIVITES D'EXPERTISE

7.1.1 Réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer

Depuis plusieurs mandatures, nous nous appuyons au niveau national sur un réseau de partenaires sur l'ensemble du territoire métropolitain mais également en outre mer (principalement Martinique, Guadeloupe, la Réunion, Guyane et Mayotte) regroupant des laboratoires de biologie médicale (hospitaliers principalement mais également les grands groupes de laboratoires privés) et des cliniciens pour le diagnostic de légionellose, les laboratoires environnementaux pour la détection environnementale des légionelles et la caractérisation des souches avec l'aide des ARS pour l'envoi des souches cliniques, des échantillons cliniques pour valider ou compléter les diagnostics et des souches environnementales.

Parallèlement à ces contacts quotidiens, nous avons créé depuis plusieurs mandatures en France des réseaux de collaborations autour des laboratoires travaillant sur *Legionella*, sur le versant clinique et/ou sur l'aspect One health. Nous avons pour objectif d'organiser en 2023 un colloque national SympoLegio qui permettra entre autres le développement de collaborations et de relations entre scientifiques mais aussi aux ARS de présenter certains aspects de la surveillance en France. Nous avons organisé à plusieurs reprises des SympoLegio très appréciés (2007, 2011, 2013, 2015) remplacé par le congrès européen ESGLI en 2018 à Lyon. Le contexte COVID-19 a retardé le prochain congrès prévu en 2023.

Le CNR collabore régulièrement avec l'ensemble des équipes travaillant sur *Legionella* en France (Carmen Buchrieser, Paris ; Jean Marc Berjeaud et Julien Verdon, Poitiers ; Pierre Le Cann, Rennes ; Max Maurin, Grenoble ; Christine Lawrence et Jean Louis Hermann, Paris ; Severine Allegra et Françoise Girardot, Saint Etienne, Thierry Chesnot, Nancy.....). Le développement de ces réseaux sera privilégié et renforcé dans l'avenir et le CNR est ouvert à toutes collaborations.

Concernant plus précisément l'aspect environnemental, nous proposons au cours de la prochaine mandature de développer des partenariats forts dans le cadre du projet LEGIODOM (étude des contaminations à domicile des cas sporadiques (chapitre 7.3.5.1). Cette étude sera également l'occasion de travailler avec les différentes ARS sur les différents aspects des investigations réalisées au domicile des patients. Sur l'aspect de la résistance de *Legionella* aux antibiotiques et aux biocides, nous souhaitons travailler avec les laboratoires environnementaux nationaux et notamment dans le cadre de la persistance de colonisation de réseau malgré un traitement qui devrait être adapté.

Au niveau européen, nous collaborons régulièrement comme c'est déjà le cas avec les CNR de différents pays (Italie, Suisse, UK, Slovaquie, Allemagne, Danemark, ...). Enfin, nous sommes fortement impliqués dans le groupe ESGLI (European study Group of Legionella Infection) (membre de l'Executive committee, S. Jaraud) avec notamment pour objectif de développer les collaborations européennes en terme d'expertise microbiologique. Nous serons impliqués comme cela a été le cas dans les années antérieures dans plusieurs études collaboratives. Une étude a déjà reçu un grant européen ESCMID sur l'étude de la résistance *Legionella* aux antibiotiques.

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

7.1.2.1 Techniques pour le diagnostic et le pronostic des cas de légionelloses

*** Un des objectifs sera de contribuer au développement du diagnostic des légionelloses, notamment celles dues aux *Legionella non pneumophila* ou au *Legionella pneumophila* séro groupe non 1**

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

positifs pourrait engendrer des notifications erronées à l'ARS, des investigations inutiles et une méfiance de ces tests de la part des utilisateurs et des cliniciens.

Plusieurs actions sont envisagées :

- Disposer de différentes PCR (kits commerciaux ou PCR « maison ») pour confirmer les résultats obtenus par les laboratoires expéditeurs et si besoin, pouvoir réaliser des analyses complémentaires pour préciser l'espèce ou le sérotype
- Evaluer dans la mesure du possible les kits multiplexés
- Réaliser une information à l'ensemble des laboratoires de bactériologie mais également de virologie qui sont les 1ers utilisateurs de ces kits de nous envoyer en systématique tous les prélèvements positifs (non associés à une antigénurie positive)
- Sensibiliser sur la meilleure détection des infections à Lp non 1 que peuvent apporter ces kits mais aussi sur le fait que fréquemment, la cible de ces kits est limitée à *L.pneumophila*, ne recherchant ainsi pas les autres espèces.

Ces évaluations permettront également de décrire l'incidence de la co-infection des cas de légionellose avec d'autres bactéries mais également avec des virus comme la grippe.

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

L'objectif est d'identifier des légionelloses notamment extrapulmonaires sans suspicion initiale par des méthodes *sans a priori*. Une des hypothèses est que ces légionelloses sont potentiellement sous diagnostiquées. La PCR universelle 16S est souvent utilisée pour les échantillons habituellement « stérile » comme par exemple les liquides articulaires et peut permettre le diagnostic des arthrites à *Legionella*. Pour les matrices plus complexes, les méthodes NGS sont utilisées. Ainsi, notre objectif est de séquencer une ou plusieurs régions spécifiques de microorganismes à partir d'un prélèvement clinique.

- une approche consiste à amplifier l'ARNr 16S et séquencer l'ensemble des amplicons en NGS ce qui permet d'identifier l'ensemble des bactéries présentes dans le prélèvement dont *Legionella*. Cette approche a déjà été utilisée avec succès pour plusieurs prélèvements cités plus haut dans le cadre de fasciite nécrosante, légionellose pulmonaire à *Legionella*, arthrite à *Legionella*. Pour cette approche, la technologie Illumina et Nanopore ont été utilisées.
- une autre approche est la capture ciblée de plusieurs ADN de microorganismes suivi de leur séquençage en NGS ce qui permet d'identifier l'ensemble des pathogènes recherchés.

7.1.2.2 Techniques pour l'identification des *Legionella*

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

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

*** Mieux caractériser les cas à *L. non pneumophila* et les co-infections par plusieurs *Legionella*.**

Alors que la PCR séquençage ciblant le gène *mip* est la méthode de référence pour identifier les *Legionella non pneumophila*, celle-ci manque de sensibilité lorsqu'elle est appliquée au prélèvement pulmonaire. C'est le cas également de la PCR 23S-5S utilisée actuellement au CNR. Nous souhaitons développer une PCR ou Nested-PCR séquençage utilisable sur échantillon clinique.

7.1.2.3 Détection des *Legionella* dans l'environnement

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

Nous avons montré l'apport indéniable de la technique de co-culture amibienne sur gélose solide (*Amoebae Plate Test*) pour l'isolement de légionelles des prélèvements pulmonaires (1). L'intérêt de la co-culture réside surtout dans la lyse des bactéries associées non intracellulaires. Nous souhaitons transférer cette méthodologie aux environnements complexes le plus souvent très riches en bactéries.

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

- (1) [Descours G, Hannelot H, Reynaud JV, Ranc AG, Beraud L, Kolenda C, et al. Adaptation of Amoeba Plate Test To Recover Legionella Strains from Clinical Samples. Carroll KC, editor. Journal of Clinical Microbiology . 2018 Feb 21;56\(5\).](#)

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

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

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

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

7.1.2.4 Contribuer au développement de nouvelles techniques de typage des *Legionella pneumophila*

***Typage des *Legionella pneumophila* par MALDI-TOF-MS.**

Des premières études sur l'utilisation de la méthode MALDI-TOF pour le typage des légionelles ont été réalisées dans le passé avec la société BioMérieux. Nous avons évalué plusieurs méthodes de traitement de l'échantillon (extractions protéiques, test de différentes matrices, de différents inocula...) et d'analyse des profils protéiques obtenus (test de différents algorithmes d'analyses, de différents logiciels : Anagnostec, Bionumériques) pour évaluer le potentiel de cette technologie en matière de typage épidémiologique des légionelles. Les résultats pouvaient être satisfaisant pour certains ST mais insatisfaisant pour d'autres.

Nous avons débuté une nouvelle collaboration avec BioMérieux qui va se poursuivre dans les prochaines années dans l'objectif de développer une méthodologie originale d'identification, de pré-typage et potentiellement de typage de *Legionella* par Spectrométrie de masse inférée par phylogénie moléculaire, basée sur la connaissance *a priori* des séquences de protéines porteuses d'informations phylogéniques observables par MALDI-TOF, comme par exemple les protéines ribosomiques. Dans cet objectif les données importantes de WGS des souches du CNR et de comparaison de souches auront un fort intérêt.

***Typage des *Legionella pneumophila* en absence d'isolats :**

Les investigations épidémiologiques sont toujours limitées par la nécessité qu'une souche de légionelle soit isolée des prélèvements cliniques et environnementaux ; or pour seulement 25% des patients atteints de légionellose, une souche est disponible. Le séquençage de génome complet devenant le gold standard pour la comparaison des souches, il est important de développer des outils permettant de s'approcher du séquençage de génome complet en absence d'isolat. Dans ce but nous travaillons sur 2 approches :

- une approche par Capture de génomes complets. Cette approche consiste à enrichir l'ADN d'intérêt par capture spécifique. En pratique, un panel de sondes de capture permettant l'hybridation spécifique de l'ADN d'intérêt (ici le génome entier de *Legionella*) est utilisé pour enrichir l'ADN d'intérêt à partir d'échantillons complexes. Plusieurs milliers de génomes de *Legionella* sont disponibles dans les bases de données publiques et dans les bases de données du CNR ce qui permet de tenir compte de la diversité génétique des génomes de *Legionella* au cours du dessin des sondes ;
- une approche par séquençage shotgun post depletion en ADN eucaryote. A l'inverse de la méthode précédente, cette approche capture à l'aide d'anticorps spécifique l'ADN eucaryote. Cet ADN capturé est éliminé ce qui a pour effet d'enrichir le prélèvement en ADN procaryote. C'est cet ADN enrichi qui est utilisé pour le séquençage shotgun à partir duquel les séquences spécifiques de *Legionella* sont extraites bio-informatiquement pour reconstruire le génome complet. Des essais préliminaires encourageants ont déjà été réalisés.

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

7.1.3.1 Mode de constitution

La collection est actuellement constituée par :

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

Concernant l'environnement, par :

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

De nouvelles espèces de légionelles sont régulièrement caractérisées. Nous avons programmé de reconstituer progressivement la collection des souches de référence notamment ATCC du CNR.

Par ailleurs dans le cadre d'études de recherche en lien avec l'activité du CNR nous pouvons être amenés à modifier génétiquement des souches ; une fois les travaux publiés ces souches sont bien sûr disponibles pour la collectivité scientifique.

7.1.3.2 Mode de stockage

Le mode de stockage des échantillons et souches est résumé en tableau 12.

Tableau 12. Modes de stockage de la collection du CNR.

TYPE D'ECHANTILLON	Conservation	T°	Durée
Tout prélèvement « important »	Tubes NUNC	-20°	Infinie
pulmonaire, LCR, Hémoc, Biopsie,... si culture et/ou AgU +	200 µL pour PCR + tubes NUNC	-20°C	Infinie
si culture et/ou AgU -	200 µL pour PCR + tubes NUNC	-20°C	Infinie
Urines positives et importantes	Tube stérile à hémolyse	-20°C	Infinie
Sérums positifs et intéressants	Tube stérile à hémolyse ou tube d'origine	-20°C	Infinie
Autre sérums	Tube stérile à hémolyse ou tube d'origine	-20°C	1 an
Souches extérieures	Contenant d'origine	amb.	Jusqu'aux résultats
Terre, Boue,...	Contenant d'origine	+5°	1 mois
SOUCHES			
CLINIQUES : - reçues d'un laboratoire extérieur - 1ère colonie isolée d'un prélèvement clinique	1 émulsion dans sang de mouton 1 émulsion sur billes 1 émulsion sur billes	-80°C -20°C	Infinie Infinie
CLINIQUES : - colonie 2 à 5 si disponible	1 émulsion sur billes	-20°C	Infinie
ENVIRONNEMENTALES	2 émulsions sur billes mises chacun dans un congélateur différent	-20°C -80°C	Infinie
REFERENCE	3x5 émulsions sur billes 1 émulsion dans sang de mouton	-80°C -20°C	Infinie
EAUX	1 émulsion sur billes	-20°C	Infinie
ADN			
ADN de souches	Microtubes	-20°C	Infinie
ADN de prélèvements	Microtubes	-20°C	Infinie

ADN des eaux	Microtubes	-20°C	1 an
--------------	------------	-------	------

Les conservations de plusieurs aliquots d'un même échantillon ou souche sont réalisées dans des congélateurs différents.

Le stockage est réalisé en différentes conditions (-20°C et -80°C) et dans différents lieux de l'IAI en fonction de la fréquence d'utilisation du matériel stocké, à l'étage du CNR (principalement à -20°C), au sous-sol de l'IAI, dans une pièce de stockage (4 congélateurs -20°C et 2 congélateurs -80°C) ou hors bâtiment pour les ressources dites « mortes » dans un bâtiment prévu pour le stockage délocalisé (congélateur -20°C).

L'ensemble des congélateurs -80°C est placé sous surveillance par sondes type SPY (logiciel SIRIUS). Concernant les congélateurs -20°C, ils sont placés sous surveillance SPY s'ils sont délocalisés ou critiques, alors que d'autres sont suivi par des relevés de température classique.

Nous nous engageons à assurer la conservation des échantillons biologiques relevant de l'activité du CNR des légionelles tout au long de ce prochain mandat.

7.1.3.3 Mise a disposition des collections

Compte tenu de l'importance de la collection, le CNR peut mettre à disposition un large éventail de souches et de prélèvements. Il dispose de l'ensemble des espèces et des sérogroupes de légionelles décrites.

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

Ces collections sont accessibles gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition) après accord et signature de la lettre d'agrément pour le transfert du matériel du CNR des légionelles qui figure en annexe 6.

Les prélèvements de patients (urines positives ou sérum positifs) peuvent être adressés anonymisés à des laboratoires médicaux hospitaliers après demande motivée dans le contexte le plus souvent de contrôle d'une technique en cours de validation/vérification et sous le seul jugement des responsables du CNR (en conformité avec le décret n° 2007-1220 du 10 août 2007). A titre d'exemple, nous avons été sollicités par le CNR de Norvège pour échanger des échantillons de sérums (15 sérums d'intérêt envoyés et 4 sérums d'intérêt reçus) dans le but de réaliser la vérification de leur méthode de screening. Ce premier échange initié en 2022 pourra être suivi les prochaines années afin d'assurer le suivi des méthodes utilisées par nos deux laboratoires.

Lors des évaluations de kits au CNR, l'utilisation d'échantillons de patients doit être précédé de la sollicitation de l'avis scientifique et éthique du Comité d'Ethique scientifique des HCL et de la mise en conformité avec la recherche n'impliquant pas la personne humaine (RIPHN) de la catégorie « Recherche sur données », le cas échéant.

7.1.4 Les travaux d'évaluations de techniques envisagés

7.1.4.1 Contribution à l'évaluation de tests pour le diagnostic des légionelloses

L'évaluation de kits pour le diagnostic de légionellose par le CNR est une demande constante des laboratoires de biologie médicale mais également des producteurs et des fournisseurs de kits. Ces évaluations nécessitent des collections de souches ou d'échantillons biologique (urines, échantillons respiratoires, sanguin) que souvent seul le CNR a à disposition du fait de l'incidence des cas de légionellose. Nous continuerons à évaluer les nouveaux kits distribués sur le territoire que ce soit notamment pour la détection des antigènes urinaires, les méthodes PCR ou les kits d'identification.

Au cours de la précédente mandature nous avons organisé une grande étude européenne pour évaluer en parallèle et par 9 CNR européens 16 kits de détection des antigènes urinaires (voir chapitre 3.2.1.2).

Nous avons pour objectif d'évaluer les tests PCR à disposition en France car plusieurs fournisseurs arrêtent la commercialisation de leur kit alors que les demandes de réaliser les PCR *Legionella* augmentent dans les Centres Hospitaliers.

Deux évaluations vont être organisés dans les prochains mois avec le CNR de Suisse concernant les kits détectant *L. pneumophila* et l'ensemble des *Legionella* (kits Mikrogen et Clonit dsistribués par Launch Diagnostic).

7.1.4.2 Evaluation du kit C4 Diag LFA

La technologie de C4Diagnostics est séduisante et basée sur la culture et a pour objectif de détecter et de concentrer les légionelles d'un prélèvement respiratoire. Le processus consiste à assimiler et intégrer une sonde à la membrane, à l'aide d'un sucre synthétique assimilé lors de la réplification spécifiquement. Une fois métabolisé, par la voie métabolique naturelle du micro-organisme, le sucre et la sonde sont transférés à la surface. Ce point d'ancrage permet ensuite, au moyen d'une réaction de chimie click, d'associer des sondes classiques telles qu'un marqueur fluorescent ou sonde enzymatique pour détecter, dénombrer et / ou identifier les microorganismes d'intérêt ; ou des billes magnétiques destinées à concentrer / isoler uniquement les micro-organismes d'intérêt cultivables.

Une première étude d'évaluation a été faite sur 100 échantillons congelés (étude rétrospective) caractérisés avant congélation : LBA ou aspiration bronchique de patients montrant des signes d'infection respiratoire, négatifs par PCR ou négatifs par PCR et culture, et des échantillons positifs par PCR et/ou culture.

Les échantillons sélectionnés comme positifs doivent être positifs par culture après décongélation pour s'assurer de la viabilité des bactéries. Une étude prospective sera également réalisée sur des échantillons frais.

Une évaluation multisite européenne avec les CNR d'Italie, du Danemark, et de Slovénie est en cours en 2022.

7.1.5 Les projets de transferts de techniques vers d'autres laboratoires

Le CNR est à la disposition des laboratoires académiques et hospitaliers pour les accompagner dans l'implantation locale des techniques d'identification, de caractérisation et de typage des souches de légionelles dans leur laboratoire. Cette ouverture aux transferts de technologie est aussi ouverte à nos collègues étrangers.

Les transferts de techniques se font le plus souvent dans le cadre de collaboration ou par le biais de stagiaire au laboratoire (voir la liste des stagiaires précédemment).

Nous avons été sollicités par nos collègues Italien pour la caractérisation de nouvelles souches de *Legionella*. Il est prévu que le Dr. Luna Girolamini vienne au CNR pour apprendre certaines techniques et collaborer avec nous sur cette thématique : "The development of bioinformatic tools to evaluate the antibiotics gene resistance to support the characterization of novel *Legionella* species discovered in the Emilia-Romagna region."

L'objectif principal de la visite sera de caractériser de nouvelles espèces de *Legionella* en utilisant différentes approches (1) notamment sur le plan génomique en utilisant la technologie de séquençage Nanopore (MinION) avec une nouvelle chimie ce qui permettra de ré-étudier les séquences précédemment obtenues avec la technique de séquençage Illumina ; (2) l'évaluation de la résistance aux antibiotiques de ces nouvelles espèces de *Legionella* par méthode bioinformatiques ou par des tests *in vitro* en utilisant la méthode de microdilution en bouillon ; (3) d'évaluer la croissance intracellulaire de *Legionella* dans des amibes (cellules *Acanthamoeba castellanii*) et des macrophages humains (cellules U937) en mesurant l'intensité de la fluorescence émise par mCherry ou GFP avec un lecteur de plaque TECAN InfinitePro grâce à des souches de *Legionella* construites avec un plasmide exprimant mCherry ou GFP.

7.1.6 Les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR

7.1.6.1 Evolution des populations des *Legionella* en fonction du temps

Le CNR dispose d'une collection d'isolats cliniques débutant dans les années 80 (quasiment depuis le début de la description de *Legionella*). Nous avons pour objectifs de séquencer les isolats de ces années là et de comparer leurs génomes par rapport aux isolats de ces dernières années pour voir s'il y a une évolution dans les populations de *Legionella* entre les années 80 et aujourd'hui que ce soit au niveau génotypes mais aussi gènes de résistance, facteurs de virulence.

7.1.6.2 Analyse comparative de génomes de *Legionella pneumophila* par GWAS pour l'identification de déterminants génomique spécifiques

Nous souhaitons utiliser les données de WGS de la collection de souches du CNR associées aux données clinico-biologique pour tenter d'identifier des déterminants génomiques qui pourraient être associés à certains paramètres cliniques ou biologiques grâce à l'outil dbGWAS (De Burjin Genome Wide Association Study). Cette approche a été utilisée pour les signes extra pulmonaires de type digestifs ou neurologiques souvent associés à la pneumonie au cours des légionelloses. Les mécanismes impliqués dans ces signes extra pulmonaires ne sont pas clairement établis. Les données des génomes complets de 416 souches cliniques isolées d'échantillons pulmonaire ont été analysés par l'outil dbGWAS permettant de comparer les génomes des souches associées à un critère clinique à celui de souches non associées à ce

même critère. Les phénotypes cliniques étudiés ont été la présence ou l'absence de signes digestifs, neurologiques, de confusion et de sévérité. Aucun variant associé à une significativité élevée n'a été identifié. Cette analyse préliminaire n'avait pas permis l'identification de déterminants génomiques de virulence responsables des signes digestifs et neurologiques observés au cours de la légionellose. Nous souhaitons compléter ces analyses par une étude sur un nombre plus conséquent de patients et étendre ces travaux sur d'autres critères et d'autres logiciels outils d'analyse (Pyseer, treeWAS).

7.1.6.3 Identification de Biomarqueurs pour le diagnostic ou le pronostic des légionelloses

***Identification de biomarqueurs pronostiques dérivés du microbiote digestif, pulmonaire et sanguin chez les patients atteints de légionellose par approche combinée de métagénomique et métabolomique**

La légionellose due à la bactérie *Legionella* est une cause importante de pneumonie aiguë communautaire (PAC). Le taux de mortalité reste élevé (10% en global, jusqu'à 30% pour les patients admis en Unités de Soins Intensifs (USI)) malgré l'amélioration du diagnostic et de la prise en charge thérapeutique. Il n'existe pas actuellement de marqueur pronostique de la légionellose qui pourrait orienter la prise en charge thérapeutique et potentiellement réduire le taux de mortalité.

De nombreuses études ont révélé la relation entre l'intestin et le poumon, appelée axe intestin-poumon, et ses implications cliniques. Il est largement décrit que le microbiote intestinal joue un rôle dans la réponse immunitaire contre les infections respiratoires. Des études indiquent que les infections respiratoires virales comme la grippe et la COVID-19 modifient la composition du microbiote intestinal, entraînant une dysbiose intestinale avec une diminution des bactéries commensales productrices de butyrate et des bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte (AGCC). De plus, d'autres données montrent, qu'au cours de la grippe, la diminution de la production des AGCC par le microbiote intestinal dysbiotique affecte la bactéricidie des macrophages alvéolaires, entravant les défenses pulmonaires de l'hôte et contribuant aux surinfections bactériennes pulmonaires. L'utilisation de probiotiques (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) a montré une réduction de la gravité de la grippe bien que les mécanismes soient encore peu compris. Peu de données sont disponibles concernant le rôle de l'axe intestin-poumon au cours des infections respiratoires aiguës bactériennes. Il apparaît donc particulièrement intéressant de l'explorer dans la légionellose, dont l'une des particularités est l'association de symptômes extrapulmonaires dont les diarrhées dans 20 à 50% des cas.

Il a été démontré que des facteurs tels que la dissémination systémique de composants dérivés des bactéries et de produits de dégradation métabolique exercent leurs fonctions le long de l'axe intestin-poumon. Récemment, des approches de métabolomique sérique ont révélé des changements métaboliques lors de PAC et ont établi une signature métabolique sérique liée à la gravité de l'infection. Ces données ont par exemple été confirmées dans le cas de la pneumonie H1N1, qui induit un profil métabolique plasmatique très différent de celui de la pneumonie bactérienne et de celui de sujets témoins ventilés en USI, au début de l'évolution de la maladie. Aucune donnée n'est disponible à ce jour concernant le métabolome digestif, pulmonaire et sanguin au cours d'une légionellose.

Cette étude pilote, intégrée à l'étude ProgLegio, a pour objectif de caractériser chez des patients atteints de légionellose de sévérité variable des biomarqueurs innovants de sévérité et pronostiques en explorant conjointement les microbiotes digestif, pulmonaire et sanguin et leurs métabolites par une approche combinée de métagénomique et métabolomique.

Identification de composés organiques volatils (VOCs) des *Legionella

Nous travaillons en collaboration avec le Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions - UMR CNRS 7267 - Equipe Microorganismes - Hôtes – Environnements de l'université de Poitiers (J. Verdon et JM Berjeaud) à la caractérisation du volatilome de *Legionella in vitro*. En plus du caractère novateur de cette description, la caractérisation du volatilome de *Legionella* pourrait permettre l'identification de marqueur spécifique de cette bactérie utilisable comme marqueur diagnostic recherché directement dans l'air expiré du patient. Ce genre d'approche a déjà été expérimenté avec succès pour la détection de *Mycobacterium* ou du Sars-cov2. Certains partenaires indispensables ont été identifiés ; la réponse à des appels à projets est en cours.

7.1.6.4 Etude sur la réponse de l'hôte à l'infection par *Legionella*

*** Réponse immunitaire et Energie**

Dans le cadre de l'étude ProgLegio, nous avons étudié la réponse immunitaire sur une trentaine de patients sévères (SOFA \geq 5 ou non sévères). Nous montrons que ces patients ont un déficit fonctionnel de sécrétion cytokinique (TNF α et IFN γ) suite à la stimulation de leur sang total par des activateurs non spécifiques (LPS, SEB, Concanavalline A). Par ailleurs, un panel de 96 gènes de l'immunité a été étudié par analyse Nanostring (expression des ARNm). Les résultats montrent que certaines voies de l'immunité sont diminuées et d'autres sont augmentées chez les patients et le sont encore plus fortement chez les patients les plus sévères. Dans la prochaine mandature, nous avons pour objectif de suivre l'état immunitaire des patients à distance de l'infection pour identifier des stigmates sur le long terme ou une possible susceptibilité d'hôte aux légionelloses sévères.

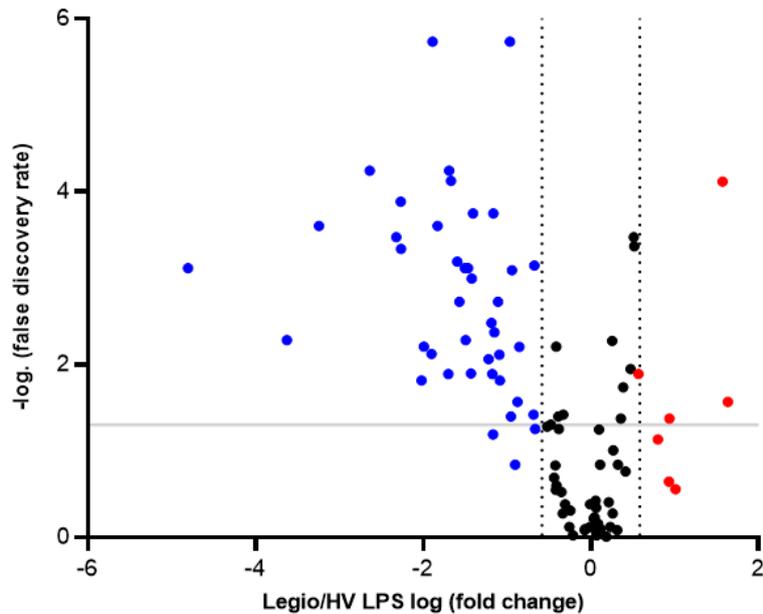


Figure 36 : Expression différentielle de 96 gènes de l'immunité chez les patients atteints de Légionellose en comparaison avec des volontaires sains (stimulant LPS)

*Défaut génétique de l'immunité prédisposant aux infections sévères à *L. pneumophila*

Notre objectif principal est d'identifier des facteurs génétiques humains qui prédisposent aux infections graves à *Legionella*, en impliquant soit le système immunitaire, soit d'autres voies métaboliques, en utilisant une approche de séquençage de l'exome entier (WES) sur une grande cohorte nationale de patients atteints de légionellose. Pour atteindre cet objectif, nous stratifierons les patients entre légionellose sévère et non sévère. Le score SOFA (Sepsis related Organ Failure Assessment) est le premier critère d'évaluation de la gravité des patients. Nous avons également recueilli d'autres marqueurs de gravité (intubation, durée du séjour à l'hôpital ou en soins intensifs) qui peuvent être associés aux résultats du WES.

Notre population est composée de 126 patients atteints de légionellose dont nous avons collecté des échantillons de sang à des fins génétiques au moment initial de leur inclusion dans l'étude " ProgLegio ". La cohorte prospective ProgLegio est enregistrée sur clinicaltrials.gov : NCT03064737 ; les Hospices Civils de Lyon en sont le promoteur (69HCL16_0131). Ce WES sera réalisé sur la plateforme de séquençage du CHU de Lyon. Dans un travail préliminaire, un séquençage de l'exome entier a été réalisé par le Laboratoire de génétique humaine des maladies infectieuses (HGID) (INSERM UMR 1163, Laurent Abel) pour 4 patients de la cohorte ProgLegio. Ils ont montré que 2 gènes candidats ont muté chez 2 patients : une mutation du site d'épissage d'un gène associé à l'inflammasome, et une mutation d'un gène régulateur de l'activation du complément. Ces données sur seulement 4 patients sont très encourageantes pour étendre l'étude à la grande cohorte ProgLegio.

7.1.6.5 Caractérisation des co-infections au cours de la légionellose

* Caractérisation des co-infections multi-espèce

Le CNR a développé des approches par PCR multiplex -NGS permettant la détection des co-infections multi-espèce et/ou multi ST directement à partir des prélèvements cliniques des patients (voir paragraphe 3.2.5). Deux co-infections ont été mises en évidence en 2021.

* Diversité génomique de *Legionella* chez un même patient

Depuis plusieurs années se pose la question de la diversité génétique de la bactérie dans l'échantillon et donc chez le patient. Pour répondre à cette question, nous avons comme projet de caractériser la diversité génétique de *L. pneumophila* au sein d'un même prélèvement respiratoire en séquençant le génome de plusieurs souches isolées du même prélèvement clinique. Dans ce but, le CNR a collecté depuis 2011, 5 à 10 colonies par prélèvement positif, ce qui constitue

aujourd'hui une collection de plusieurs milliers de souches isolées de plusieurs centaines de patients que nous continuons d'incrémenter. Cette étude permettra entre autres de déterminer le nombre d'isolats à analyser par patient au cours des enquêtes épidémiologiques pour couvrir de façon optimale la diversité génétique bactérienne intra-patient.

* Co-infection *Legionella* – *Pneumocystis jirovecii*

Des diagnostics de co-infection sont régulièrement observés (*Pneumocystis jirovecii*, mycobactéries ...) sans que leur incidence et leur implication clinique réelle ne soient bien décrites. Nous envisageons de mieux décrire ces cas et d'y associer les données d'analyse du microbiote respiratoire. Une analyse rétrospective (2015-2021) en collaboration avec le service de Parasitologie-Microbiologie du CHU de Lyon (Pr M. Wallon) portant sur des patients hospitalisés au CHU de Lyon et au Centre Léon Bérard a permis d'identifier une quarantaine de patients pour lesquels des PCR positives ont été observées à la fois pour *Pneumocystis* et *Legionella*. L'analyse des données cliniques et biologiques est en cours afin de mieux caractériser ces patients et l'implication de chacun de ces pathogènes dans la pathologie pulmonaire. Ce travail fait actuellement l'objet d'une thèse pour l'obtention du DES de Biologie Médicale (Anne-Lise Maucotel).

7.1.6.6 Caractérisation de la résistance aux antibiotiques et aux biocides

La question de la résistance aux antibiotiques chez *Legionella*, événement rarement décrit jusqu'à présent, et de son implication dans les échecs thérapeutiques se pose depuis plusieurs années. Pour répondre à cette question, durant le mandat 2017-2021, le CNR a mis en œuvre de façon plus systématique une étude de la sensibilité des souches cliniques aux antibiotiques (n=500) et a sollicité des industriels pour des solutions commerciales alternatives à la technique « maison » qui reste chronophage (cf 3.2.3.2, Micronaut-S). En 2022-2023, ces activités seront poursuivies avec notamment l'évaluation de la technique Sensititre où nous évaluerons les performances d'une plaque 96-puits produite à façon sur un panel de 500 souches : (i) souches cliniques de Lp1 pour laquelle nous possédons des valeurs de CMI avec les techniques « maison » et Micronaut-S, (ii) souches résistantes aux antibiotiques, et de façon prospective (iii) souches cliniques isolées en 2022-2023.

Le CNR contribuera également à l'étude européenne « Pan European Standardization of *Legionella* susceptibility testing » (ESCMID grant, coordination : Brad Spiller, UK) pour l'évaluation européenne de la sensibilité d'un panel de souches européennes de *Legionella* aux antibiotiques. Cette étude permettra de définir la distribution de CMI d'antibiotiques pour un large panel de souches avec une technique standardisée et reproductible d'un laboratoire à l'autre, et de définir au niveau européen (EUCAST) les ECOFF au-delà desquels une résistance doit être suspectée.

Parallèlement, le CNR a développé un pipeline permettant une approche systématique de détection de la résistance aux antibiotiques à partir des données de WGS (cf 3.4.3). Plus de 3000 génomes ont été analysés à ce jour. Le CNR poursuivra cette analyse pour des souches d'origine clinique mais aussi environnementale.

Cette approche a permis la mise en évidence de souches environnementales présentant une résistance de haut niveau aux macrolides pour la première fois dans le cadre de l'investigation autour d'un cas (cf 3.5.1). Les investigations menées à ce jour ont montré la persistance de ces souches au niveau du réseau d'ECS de l'établissement en question. Un suivi microbiologique sera réalisé sur ce réseau particulier à très haut risque pour les patients. Par ailleurs, nous rechercherons la présence d'une pression de sélection par des dosages de macrolides dans des matrices environnementales de façon élargie : affluents, nappes alluviales, et si positifs, terres, boues, etc environnantes. Ces travaux seront menés à partir d'une cartographie du réseau d'eau et des activités « à risque » en termes de pression de sélection antibiotique (culture animale) en collaboration avec l'ARS ARA.

L'hypothèse d'une résistance croisée avec des biocides sera également explorée. Cet axe nécessitera de déchiffrer les mécanismes de résistance aux biocides afin de développer des méthodes standardisées d'évaluation de la sensibilité de *Legionella* aux biocides adaptées. Cela nous permettra de répondre aux sollicitations croissantes des laboratoires réalisant la surveillance de réseaux d'eau et observant une persistance de *Legionella* malgré des paramètres (biocides, températures...) maîtrisés (collaboration avec le CHU de Saint-Etienne et laboratoires privés).

Ces travaux sur les biocides constituent ainsi une proposition d'axe de recherche pour le mandat 2023-2027. En effet, les biocides sont des produits très utilisés en Santé humaine et vétérinaire, mais également dans les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques, pétrolières, ou de façon moins connue dans les industries produisant la plupart des biens

de consommation courante (produits d'hygiène, cosmétiques, ustensiles, jouets, textiles...). La problématique croissante de la résistance aux antibiotiques à l'échelle mondiale aujourd'hui très médiatisée a renforcé leur consommation. Si leur utilisation présente un bénéfice indéniable en santé humaine et animale, leur libération dans l'environnement n'est pas neutre. Il est désormais démontré pour différents bacilles à Gram négatif de l'environnement (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, entérobactéries) que présents à faible concentration, ils exercent une pression sélectionnant des sous-populations pouvant évoluer durablement vers une tolérance aux biocides, mais aussi vers une tolérance voire une résistance aux antibiotiques, en particulier fluoroquinolones. Les données sur l'impact des biocides sur *L. pneumophila* au niveau international sont quasi inexistantes. A ce jour, une seule étude a décrit l'impact du chlore sur la réponse transcriptionnelle de *L. pneumophila*. Il apparaît donc important d'investiguer l'impact de différents biocides sur *L. pneumophila* en caractérisant (i) les réponses adaptatives des principaux clones bactériens aux biocides par des méthodes phénotypiques et des méthodes de génomique comparative et transcriptomique RNASeq et (ii) leur impact sur la sensibilité aux antibiotiques. Ces données permettront de développer des outils adaptés à la recherche d'une tolérance et /ou résistance. Un projet portant sur cette thématique a été proposé dans le cadre d'une demande d'Année Recherche pour une interne en Biologie médicale de la sub-division de Lyon pour l'année 2022-2023.

7.1.7 Possibilité de montée en charge de ses capacités pour répondre à une situation sanitaire exceptionnelle et les modalités effectives de mise en œuvre (réorganisation, transfert de ressources, mobilisation de partenaires ...)

Si le CNR des légionelles devait faire face à une situation sanitaire exceptionnelle impliquant un afflux important de prélèvements et/ou de souches bactériennes nécessitant des ressources humaines et analytiques importantes, il bénéficie d'un environnement permettant une ré-allocation rapide de moyens techniques et humains au travers :

- la plateforme de séquençage GenEPII qui a été mise en place conjointement avec santé publique France et les HCL pour faire face à la crise sanitaire liée au Sars-Cov2. Cette plateforme est en mesure de répondre à une situation sanitaire exceptionnelle avec à la fois une filière d'urgence (par exemple rendu de résultat d'un séquençage Sars-Cov2 urgent en 12h) et une filière de production capable de générer plusieurs milliers de séquences par semaine (plus de 4500 génomes de Sars-Cov2 par semaine au plus fort de la crise sanitaire). Nous avons activement participé à la mise en place de cette plateforme et sommes capables à l'aide de celle-ci de faire face à une situation sanitaire exceptionnelle impliquant *Legionella* et nécessitant des analyses génomiques rapides et/ou de masse.
- des ressources humaines des autres CNR (Staphylocoques, Enterovirus et Pachevirus, Virus des infections respiratoires) mais aussi au sein de l'Institut des Agents infectieux des personnels des plateaux de cultures conventionnelles (52 ETP) et de biologie moléculaire (20 ETP) et du secrétariat (12 ETP), qui bien que ne travaillant pas directement au CNR partagent les mêmes outils informatiques d'enregistrement et de saisie des résultats, les mêmes locaux et les mêmes outils techniques. La crise sanitaire a montré une collaboration étroite et possible des différents personnels du LBMMS qui, quel que soit leur discipline d'origine, ont pu être mobilisés pour faire face à une situation exceptionnelle. Cette solidarité inter-service pour le personnel non médical (techniciens, secrétaires, responsables de l'enregistrement des prélèvements, ...) et médical est envisageable en cas de situation sanitaire exceptionnelle impliquant *Legionella*.

7.2 ACTIVITES DE CONSEIL, FORMATION ET INFORMATION

7.2.1 Projets de formation envisagés

Le CNR continuera de participer à différents programmes de formation (voir chapitre 3.3.5.1) pour permettre le renforcement du diagnostic de légionellose, de la détection environnementale et de l'investigation des cas. Il continuera à intervenir au sein de l'Institut Pasteur, Santé publique France, les Universités (Tours, Marseille ...) dans des programmes de formation et participera aux colloques et journées de formation à la demande de différents organismes privés et publics.

7.2.2 Modalités de diffusion de recommandations et informations aux professionnels concernés et les modalités prévues de rétro-information vers l'ensemble des partenaires du CNR

Pour la diffusion des conseils, des informations aux professionnels et la rétro-information des partenaires, le CNR propose de reconduire le modèle adopté jusque là en cherchant à l'améliorer : chaque demande adressée au CNR continuera à faire l'objet d'une réponse individualisée apportant le maximum d'informations afin d'améliorer la prise en charge des patients concernés ou de gérer au mieux les situations épidémiologiques rencontrées.

L'amélioration portera sur le mode de transmission de ces résultats et conseils qui fera appel à un système de transmission sécurisée dans le cadre du projet de Télémédecine développé par la Direction des Systèmes d'Information pour la Direction Générale des HCL. Ce système permet un rendu en temps réel aux prescripteurs des résultats, avis spécialisés du CNR et conseils sur un serveur sécurisé « HYBRID Biologie » qui assure ainsi la sécurité et la traçabilité des résultats. Ce serveur de résultats spécifique (HYBRID Biologie) est disponible pour tous les établissements extérieurs. L'accès au serveur de résultats HYBRID peut être demandé auprès du service clientèle joignable par mail à l'adresse suivante : relationclient.lbmms@chu-lyon.fr. Ce serveur ne se substituera pas aux moyens de communication direct (téléphone) ni au site internet du CNR (<http://cnr-legionelles.univ-lyon1.fr>) qui permet la diffusion aux professionnels des modalités de fonctionnement du CNR, les fiches d'envoi des souches ou échantillons, les bilans d'activités et publications du CNR, les informations sur les formations et congrès. Il comporte un site dédié spécifiquement à l'étalon primaire distribué par le CNR au niveau national et international, le site dédié à l'étalon contient les pages en français et en anglais.

Le site internet du CNR a été créé en 2005 (<http://cnr-legionelles.univ-lyon1.fr>). Ce site a l'avantage d'être hébergé gratuitement sur le serveur de l'université de Lyon (Claroline connect). Une migration de Claroline Connect sur Moodle est prévue en 2024.

De part l'hébergement du site encore incertain dans le futur, nous envisageons conjointement avec le CNR des staphylocoques de transférer ce site vers un autre hébergement et serveur durant la mandature. Cela permettra la réorganisation complète du site et nous envisageons comme pour le site de l'étalon ADN, de créer quelques pages en anglais pour avoir une meilleure visibilité vis à vis de nos correspondants européens.

7.2.3 Collaborations à des expertises éventuellement prévues auprès d'instances nationales ou internationales

Nous continuerons à expertiser les cas européens déclarés par **ELDSNet** et pour lesquels une exposition à risque suspectée se situe en France.

Nous collaborerons avec toutes instances nationales ou internationales qui souhaiteront notre expertise comme nous le faisons depuis de nombreuses années (**DGS, HCSP, ANSES, AFNOR...**).

7.3 CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE

7.3.1 Projets de constitution, développement et animation de réseaux de partenaires

* Au niveau national, maintien de collaboration avec les ARS autour de Santé publique France

Sur le plan de la surveillance, le CNR a favorisé et favorisera ses relations avec les différents laboratoires de biologie médicale (aide au diagnostic, envoi de courriers réponse lors d'investigation), les laboratoires environnementaux et les différentes ARS conjointement avec Santé publique France.

Bien que peu d'épidémie (plus de 10 cas) n'ait été identifiée de 2018 à 2021, il est important d'investiguer méthodiquement et sans délai toutes les suspicions de cas groupés afin de limiter le nombre de cas et d'identifier toute éventuelle source de contamination. Il est donc indispensable de maintenir la réactivité de l'ensemble des partenaires locaux et poursuivre la promotion de la réalisation systématique de prélèvements respiratoires qui permettent d'une part d'identifier par PCR les cas de légionellose non détectés par les tests antigènes urinaires (plus spécifiques pour *Legionella pneumophila* séro-groupe 1) et d'autre part de disposer de souches permettant la documentation des cas groupés et par comparaison avec les souches environnementales, d'identifier les sources probables de contamination.

Nous avons le projet d'organiser à nouveau un congrès national SympoLegio en 2023 à Lyon qui a pour vocation de favoriser les échanges scientifiques et le partage des connaissances sur des sujets transversaux concernant notamment l'environnement, les données épidémiologiques de la légionellose, la surveillance et la prévention, les approches de WGS et de résistance aux antibiotiques / biocides.

* Au niveau international ou européen

Nous continuerons de participer activement au groupe ESGLI (European study Group of *Legionella* Infection, actuellement membre de l'executive committee) et aux réunions annuelles de l'ELDSNet au cours desquelles peuvent être prises des décisions comme le souhait d'inclure la PCR dans la définition des cas certain de légionellose. Les réunions du groupe de travail international qui s'est mis en place sur le NGS et *Legionella* sont de nouveau actives depuis 2022, nous continuerons notre participation.

Sur le plan de la surveillance de la sensibilité aux antibiotiques, nous avons eu un point important tant sur la diffusion des méthodes phénotypiques de détection (EUCAST, accueil de stagiaire au CNR), sur la description des mécanismes de résistance (plusieurs publications et communications), sur la description de la première souche résistante à haut niveau aux macrolides détectée dans l'environnement, sur la mise en place de pipeline permettant l'identification de ces résistances des données de séquençage (plusieurs communications européennes et demande depuis de collaborations). Nous souhaitons bien sûr continuer à avoir un point sur cette thématique dans les prochaines années et nous intéresser en parallèle à la problématique des biocides.

Nous participerons comme nous le faisons déjà aux comités scientifiques des différents congrès européen et internationaux sur la thématique *Legionella*.

7.3.2 Modalités de surveillance de la résistance aux anti-infectieux et aux biocides

Bien que la résistance aux antibiotiques ne soit pas une problématique émergente pour *Legionella* à la différence de nombreux pathogènes, il est important de continuer de disposer d'outils pour réaliser cette surveillance. Nous poursuivrons la veille actuellement réalisée par l'application systématique d'un pipeline permettant de détecter la résistance aux antibiotiques à partir des données de WGS. Les techniques d'antibiogramme par microdilution resteront disponibles et complémentaires ; elles viendront confirmer les données de séquençage. Notre objectif à court terme reste de disposer de solutions commerciales montrant une bonne corrélation à la technique « maison » actuellement utilisée, plus faciles à mettre en œuvre.

Notre contribution aux nouvelles recommandations européennes de l'EUCAST pour la réalisation d'antibiogrammes (cf 3.2.3.1) et notre participation à une étude pour l'établissement d'ECOFF permettra une diffusion de la méthodologie utilisée et une harmonisation des pratiques au niveau européen (EUCAST). Elle permettra aux laboratoires européens ne disposant pas de techniques de NGS une meilleure surveillance de la résistance aux anti-infectieux.

Afin de répondre aux demandes de laboratoires environnementaux sur la persistance de légionelles dans certains réseaux, des méthodes de surveillance de la résistance aux biocides seront développées. Les données de la littérature sur *Legionella* et biocides sont quasi-inexistantes. Le déchiffrement des mécanismes de tolérance / résistance aux biocides est une étape préliminaire permettant la mise en place de techniques de surveillance, il constitue un axe de recherche appliquée pour le mandat 2023-2027.

7.3.3 Contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels

Le bilan d'activité 2017-2021 montre que nous avons pu contribuer à la détection et l'investigation de cas groupés, ainsi qu'à l'identification de nouvelle source de contamination (chauffage biomasse à Strasbourg par exemple). Nous avons aussi montré notre capacité à analyser les surcidence saisonnière particulièrement marquée en 2018 et 2021. L'identification de ces phénomènes inhabituels est possible et facilitée grâce à la mise en place de nouveaux outils (NGS, plateforme GENEPII) et de bases de données pour les exploiter. Nous utilisons notamment les bases de données européennes de Sequence Based Typing du Public Health England. Nous utiliserons dans l'avenir les bases de données de génomes définis au niveau international (groupe de travail NGS de ESGLI auxquels nous collaborons).

Nous avons également la capacité de réaliser une veille sur la résistance des légionelles aux antibiotiques même si la résistance n'apparaît pas une problématique majeure pour *Legionella*.

Enfin, grâce aux contacts avec de nombreux cliniciens et microbiologistes, nous surveillons les cas de légionelloses atypiques comme les cas extra-pulmonaires (fasciites, abcès, arthrites, ..) ou les cas persistants chez les populations immunodéprimées.

L'utilisation de ces outils, leur développement et leur utilisation de manière systématique nous permettra de répondre aux exigences du prochain mandat. Enfin, l'étude LEGIODOM (cf. 7.3.5.1.1) nous permettra d'explorer les domiciles comme source probable de contamination.

7.3.4 Contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux ;

*** Sur le plan européen, nous participons activement au système de surveillance européen (ELDSNet) :**

- participation annuelle aux congrès ELDSNet et ESGLI
- participation aux investigations européennes lors du diagnostic d'un cas Français au retour d'un voyage à l'étranger ou lorsqu'un établissement Français est suspecté pour un cas de légionellose étranger.

- participation en tant que « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen pour l'ECDC. Nous avons par exemple participé aux discussions de modifications des critères européens de définition d'un cas de légionellose en 2010.
- collaboration avec les laboratoires CNR des pays européens, notamment avec la Hollande (JP Bruin, Jeroen Den Boer), l'Angleterre (Vicki Chalker, Fry Norman, Massimo Mentasti), l'Allemagne (Christian Luck), la Suisse (Valeria Gaia),

* **Nous participons au groupe européen ESCMID sur *Legionella* (ESGLI)** en étant à l'executive committee. Nous participons aux collaborations entre équipes dans ce cadre qui peuvent être en lien avec la surveillance

* **Nous participons au groupe de travail européen ESGLI sur le *Next-generation sequencing* (NGS)** appliqué aux légionelles crée en Septembre 2015.

7.3.5 Projets d'enquêtes ou études concourant à la surveillance.

7.3.5.1 Plan National Santé-Environnement, action n°12 en lien avec Santé publique France et la DGS/DGPR

L'action 12 du **Plan National Santé-Environnement 4** « Un environnement, une santé » (PNSE 4, 2021-2025) porte sur la prévention de la légionellose : « *Mieux comprendre et prévenir les cas de légionellose* ».

L'action 12 est composée de deux axes :

- Un 1^{er} axe visant à identifier l'influence des facteurs météorologiques dans la survenue des cas de légionellose et comprendre l'origine de l'augmentation du nombre de cas de légionellose détectés (et notamment les situations observées en juin 2018 ainsi qu'à l'été 2021) ;
- Un 2^{ème} axe visant à explorer la part potentielle des contaminations à domicile via les réseaux intérieurs de distribution d'eau.

7.3.5.1.1 Etude LEGIODOM - explorer la part potentielle des contaminations à domicile via les réseaux intérieurs de distribution d'eau

Il est prévu que le deuxième axe du PNSE4 se traduira par une étude exploratoire qui sera mise en œuvre à compter de 2023 sur une période de deux ans. Si le CNR actuel est renouvelé, nous participerons en première ligne en tant que coordonateur à cette étude nommée LEGIODOM en collaboration avec la Direction des maladies infectieuses de Santé publique France (SpF) et l'appui de la Direction générale de la santé (DGS). Un protocole est en cours d'élaboration en concertation entre SpF et la DGS/DGPR et inclura la réalisation de prélèvements d'échantillons d'eaux à domicile pour recherche et dénombrement de légionelles, complétée par une caractérisation par le CNR des souches de *Legionella* qui auraient été retrouvées.

Contexte : Les résultats de comparaison entre les souches cliniques et environnementales réalisées depuis 2008 par le Centre national de référence des légionelles (CNR) montrent que les sources de contamination des cas investigués sont les réseaux d'eau d'établissements recevant du public (ERP) et des réseaux d'eau de domicile. En effet, 71% des 176 comparaisons concernant l'eau aux domiciles des patients, réalisées entre 2008-2020 ont révélé des profils de souches identiques. Cependant ces comparaisons de souches font suite à des investigations environnementales ciblées et réalisées dans le cas d'une forte suspicion de la source de contamination à domicile. Elles ne permettent pas de mesurer la part potentielle des contaminations à domicile parmi l'ensemble des sources de contamination des cas, notamment pour les cas sporadiques qui représentent la majorité des cas actuellement.

Afin d'améliorer les connaissances sur les sources de contamination des cas de légionellose, il s'avère primordial de documenter la part des cas de légionellose pouvant être liée à une contamination à domicile *via* les réseaux de distribution d'eau. La mise en place de cette étude est encore en cours ainsi que la définition des objectifs. Les grandes lignes sont néanmoins définies.

Objectifs de l'étude

- L'objectif principal de cette étude sera de déterminer la part potentielle des contaminations à domicile dans l'ensemble des sources de contamination des cas sporadiques.
- Les objectifs secondaires sont répartis sur 3 axes :

* *Contamination des réseaux d'eau :*

- déterminer la part des domiciles pour lesquels les bactéries *Legionella* sont détectées dans l'eau des réseaux d'eau (eau froide et eau chaude)
- déterminer la distribution des espèces et sérogroupes de *Legionella* identifiés dans les réseaux d'eau aux domiciles
- déterminer les taux de contamination (concentration en UFC/L) de l'eau des réseaux d'eau aux domiciles
- comparer les taux de positivité et taux de contamination de l'eau des réseaux d'eau aux domiciles obtenus selon la méthode PCR (UG/L) versus la méthode réglementaire par culture (UFC/L, NFT 90-431)
- déterminer les taux de contamination (concentration en UFC/L et UG/L) de l'eau des réseaux d'eau des domiciles identifiés comme source de contamination
- identifier les facteurs favorisant la contamination du réseau d'eau : type d'habitation (collectif/individuel), type de production d'eau chaude sanitaire (solaire, instantané, accumulation...), équipements en place sur les réseaux d'eau, protection contre les retours d'eau et calorifugeage des réseaux, la température de l'eau, l'aspect de l'eau, les taux de désinfectant (chlore), le pH, via un questionnaire.
- comparer la contamination de l'eau chaude versus l'eau froide (stratégie d'échantillonnage)
- comparer la contamination des robinets (évier et salle de bains) versus les douches

* *Caractéristiques microbiologiques*

- décrire les caractéristiques génomiques des souches cliniques et environnementales
- identifier les contaminations multiples dans les réseaux d'eau et la diversité génomique de *Legionella pneumophila* au sein d'un domicile
- comparaison génomique des souches environnementales responsables de l'infection (« match » avec les souches cliniques en Whole genome sequencing) et des souches environnementales non responsables de l'infection
- apport des méthodes de métagénomique (utilisables en absence de souches) pour l'identification des sources de contamination
- caractérisation microbiologique des eaux par analyse du microbiote (composition en bactéries (16S), fungi (ITS), archées (16S) et protozoaires dont *Acanthamoeba* (18S)) et association avec la contamination en *Legionella*

* *Sévérité*

- déterminer si la sévérité de la légionellose (hospitalisation en unité de soins intensifs et/ou décès versus non, autres critères si possible) peut être associée au taux de contamination au domicile des patients pour lesquels la source de contamination aura été confirmée.
- quantification des *Legionella* dans les poumons (qPCR) et contamination de l'eau

Méthodes

Cette étude sera prospective et concernera les cas de légionellose notifiés par la déclaration obligatoire avec réception d'un prélèvement respiratoire bas au CNR-L, hospitalisé en France métropolitaine entre le 1^{er} semestre 2023 et le 1^{er} semestre 2025, ayant séjourné au moins un jour à domicile dans les 14 jours précédant la date de début des signes de la maladie. Un total de 800 à 1000 cas devrait être inclus dans l'étude. Les données collectées concerneront les caractéristiques des cas, les réseaux d'eau de leurs domiciles respectifs accompagnés de prélèvements d'échantillons d'eau. Les résultats microbiologiques de comparaison génomique entre les prélèvements respiratoires et les prélèvements d'eaux de chaque cas correspondant permettront ainsi de documenter le domicile comme source la plus probable de leur contamination.

Elaboration de l'étude

Le protocole de cette étude est en cours de rédaction par le CNR-L, SpF avec appui de la DGS. Un comité d'experts de 12 personnes a été constitué pour participer à l'élaboration du montage de cette étude afin d'en finaliser le protocole. Le début de cette étude est prévu au 1^{er} semestre 2023.

Le comité d'experts de cette étude est composé par des membres des différentes institutions listées ci-dessous et enrichi par des auditions d'experts sur les réseaux d'eau.

- Centre national de référence des légionelles (S. Jarraud)
- Santé publique France - Direction des maladies infectieuses et régions (C. Campese)
- Direction générale de la santé (Marjorie Brou)
- Centre scientifique et technique du bâtiment (O. Correc)
- Laboratoire d'hydrologie de Nancy (T. Chesnot)
- Agences régionales de Santé (A. Planel, K. Alleaume, S. Langolff, S. Raguet)
- École des hautes études en santé publique (P. Le Cann)

Les résultats de cette étude exploratoire pourront permettre de développer de nouvelles actions pour mieux maîtriser le « risque légionelles », d'améliorer la prévention au plus proche des besoins des populations et à terme de diminuer de manière pérenne le nombre de cas de légionellose.

7.3.5.1.2 Documentation de l'influence des facteurs météorologiques pour expliquer le pic de cas de légionellose de juin 2018 / Juillet 2021

Une étude par SpF en juillet 2018 sur la base de l'analyse des données météorologiques de 2008 à 2015 a établi que les conditions météorologiques pourraient avoir une influence sur la temporalité d'incidence des cas de légionellose. SpF a également montré que la survenue en juin 2018 d'un pic de cas de légionellose était consécutive à une période marquée par des conditions météorologiques particulières (humidité et précipitations). Ce même phénomène (non prouvé actuellement) semble être la cause du pic de 2021.

Un des enjeux est de disposer d'un modèle prédictif qui soit en capacité d'identifier les périodes présentant des conditions météorologiques favorables à la survie des légionelles et qui permette d'anticiper la mise en place de mesures de prévention à l'attention des gestionnaires d'installations, de communication auprès du public et de sensibilisation des professionnels de santé au diagnostic.

7.3.5.2 Etude d'analyse des disparités d'incidence de la légionellose - quelles suites ?

Contexte de l'étude : finalisation par SpF en juillet 2018 de l'étude relative à l'analyse des disparités d'incidence des cas de légionellose. Les résultats de l'étude concluent sur la nécessité, pour expliquer le gradient d'incidence des cas, d'affiner le modèle de prédiction des cas élaboré dans le cadre de l'étude en y intégrant d'autres facteurs, tels que la densité des sources d'exposition. Cette étude sera menée principalement par Santé publique France mais nous pourrions être amenés à discuter les résultats.

7.4 CONTRIBUTION A L'ALERTE

La contribution à l'alerte pour *Legionella* concerne principalement la suspicion de l'identification de cas groupés par les méthodes génotypiques non identifié en amont par les données d'épidémiologie clinique. L'identification de profils identiques pour plusieurs patients nous conduits à alerter SpF. Cette alerte a pour but de vérifier l'absence de lien épidémiologique entre les patients et à la détection d'une nouvelle souche endémique. Nous continuerons à alerter Santé publique France en présence de profils identiques pour plusieurs patients lorsque ce profil n'est pas connu ou peu répandu.

Nous sommes également vigilant sur les méthodes de diagnostic utilisées en France et notamment sur les kits de diagnostic distribués en France (par exemple kit de détection des antigènes urinaires ou kits PCR). Nous pourrions alerter Santé publique France en cas de besoin comme cela a été fait il y a plusieurs années avec un kit de détection des antigènes urinaires.

L'alerte de Santé publique France sera réalisée par téléphone et associée à un courrier électronique adressé à Christine Campese. Si besoin la DGS pourra être alertée par courrier électronique à DGS-alerte (alerte@sante.gouv.fr).

De nombreuses modalités d'interface sont déjà en fonctionnement avec Santé publique France qui permettent de gérer au mieux ces alertes car les connaissances mutuelles sont partagées tout au cours de l'année par :

- des contacts téléphoniques et/ou par courriels quasi-quotidiens avec Santé publique France
- la notification hebdomadaire de l'ensemble des cas avec isolement de souches par transfert de fichier sur une plateforme sécurisée
- l'envoi d'informations par courriels sur la réception de prélèvements pulmonaires ou de souches lors d'investigation de cas groupés
- la mise en place d'un fichier informatique commun sur une interface de partage sécurisé de SpF (<https://partage.santepubliquefrance.fr/file>)
- les rencontres physiques avec Santé publique France sont pluri-annuelles : congrès ELDSNet et ESGLI, SympoLegio, COPIL et réunions de travail communes, et une réunion spécifique de discussion entre les membres du CNR et Santé publique France est programmée chaque année
- l'interaction de Santé publique France et du CNR dans plusieurs projets concourant à la surveillance

8 ANNEXES

Annexe 1. Déclaration publique d'intérêts de Sophie Jarraud.



Déclaration Publique d'Intérêts

Le 06/04/2022 23:28:15

Je soussigné(e) **JARRAUD Sophie** né(e) **JARRAUD Sophie**

Reconnais avoir pris connaissance de l'obligation de déclarer tout lien d'intérêts, direct ou par personne interposée, que j'ai ou ai eu au cours des cinq dernières années, avec les entreprises, établissements ou organismes dont les activités, les techniques et les produits entrent dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes au sein duquel/desquels j'exerce mes fonctions ou ma mission, ou de l'instance/des instances collégiale(s), commission(s), conseil(s), groupe(s) de travail dont je suis membre ou auprès duquel/desquels je suis invité(e) à apporter mon expertise, ainsi qu'avec les sociétés ou organismes de conseil intervenant dans les mêmes secteurs.

Il m'appartient, à réception soit de l'ordre du jour de chaque réunion pour laquelle je suis sollicité(e), soit de l'expertise que l'organisme souhaite me confier, de vérifier si l'ensemble de mes liens d'intérêts sont compatibles avec ma présence lors de tout ou partie de cette réunion ou avec ma participation à cette expertise. En cas d'incompatibilité, il m'appartient d'en avvertir l'interlocuteur désigné au sein de l'institution et, le cas échéant, le président de séance avant sa tenue. En cas de conflits d'intérêts, ma présence est susceptible d'entacher d'irrégularité les décisions, recommandations, références ou avis subséquents et d'entraîner leur annulation.

J'indique mon numéro RPPS (répertoire partagé des professionnels de santé), si je suis un professionnel de santé : 10004105929

Je m'engage à actualiser ma DPI à chaque modification de mes liens d'intérêts. En l'absence de modification, je suis tenu(e) de vérifier ma DPI au minimum annuellement.

Article L. 1454-2 du code de la santé publique : « Est puni de 30 000 euros d'amende le fait pour les personnes mentionnées au I et II de l'article L. 1451-1 et à l'article L. 1452-3 d'omettre, sciemment, dans les conditions fixées par ce même article, d'établir ou de modifier une déclaration d'intérêts afin d'actualiser les données qui y figurent ou de fournir une information mensongère qui porte atteinte à la sincérité de la déclaration. »

1. Activité(s) principale(s), rémunérée(s) ou non, exercée(s) actuellement et au cours des 5 dernières années, à temps plein ou à temps partiel

Activité(s) salariée(s)

HOSPICES CIVILS DE LYON

Adresse : Groupe Hospitalier Nord, Centre de Biologie Nord
Institut des Agents Infectieux
Centre National de Référence des Légionelles
103 grande rue de la Croix Rousse 69004 LYON 04 FRANCE

Fonction : Praticien Hospitalier

Période : 01/09/2002 à aujourd'hui

Spécialité : Microbiologie

UNIVERSITÉ LYON 1 - FACULTÉ DE MÉDECINE LYON EST

Adresse : 8 avenue Rockefeller 69373 Lyon France

Fonction : Professeur des Universités

Période : 01/09/2002 à aujourd'hui

Spécialité : Microbiologie

Lieu d'exercice : 69004 LYON 04 FRANCE

2. Activité(s) exercée(s) à titre secondaire

2.1. Participation à une instance décisionnelle d'un organisme public ou privé dont l'activité, les techniques ou les produits entrent dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.2. Activité(s) de consultant, de conseil ou d'expertise exercée(s) auprès d'un organisme public ou privé entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE (SFM)

Fonction occupée : membre du Conseil d'Administration

Sujet : membre du Conseil d'Administration

Rémunération : aucune

Période : 15/05/2019 à aujourd'hui

HAUT CONSEIL DE SANTÉ PUBLIQUE (HCSP)

Fonction occupée : Audition

Sujet : Evaluation globale des PNSE et à des indicateurs de suivi du PNSE4

Rémunération : aucune

Période : 22/06/2021 - 22/06/2021

HCSP (HAUT CONSEIL DE SANTÉ PUBLIQUE)

Fonction occupée : membre du groupe de travail

Sujet : avis du projet de texte concernant les brumisateurs et le risque Legionella

Rémunération : aucune

Période : 09/2016 - 09/2016

ESGLI (ESCMID STUDY GROUP OF LEGIONELLA INFECTION)

2/5

Fonction occupée : membre élu du comité exécutif - trésorière puis présidente (au 01/01/2021)

Sujet : expertise Legionella

Rémunération : aucune

Période : 09/2015 à aujourd'hui

2.3. Participation(s) à des travaux scientifiques et études pour des organismes publics ou privés entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

2.3.1 Participation à des essais et études

ANR / DGOS

Organisme financeur : ANR / DGOS

Sujet : ProgLegio : Prognostic value of microbial and host determinants for Legionnaires' disease outcome

Type d'étude : Etude multicentrique

Votre rôle : Coordonnateur

Rémunération : À l'organisme (HCL pour financement DGOS
INSERM pour financement ANR)

Montant perçu (Organisme) : Total 1 028 756 euros

Période : 01/10/2015 - 31/03/2020

ESCMID STUDY GROUP RESEARCH GRANTS 2018

Organisme financeur : ESCMID

Sujet : Evaluation of 16 assays for the qualitative detection of Legionella pneumophila antigen in urine samples from patients with pneumonia

Type d'étude : Etude multicentrique

Votre rôle : Coordonnateur

Rémunération : À l'organisme (ESGLI (ESCMID Study Group of Legionella Infection) en tant que membre)

Montant perçu (Organisme) : Total 30 000 euros

Période : 01/01/2019 à aujourd'hui

2.3.2 Autres travaux scientifiques

BIOCENTRIC

Sujet : Evaluation de plaques 96 puits MICRONAUT-S fabriquées à façon pour la réalisation d'antibiogramme de L. pneumophila

Rémunération : À l'organisme (HCL)

Montant perçu (Organisme) : Total 5 827 euros

Période : 01/01/2020 - 31/12/2021

BIORAD

Sujet : ddPCR Legionella pneumophila sur sérum et sur échantillons d'eau environnementales

Rémunération : aucune

Période : 18/12/2020 - 31/03/2021

BIOMERIEUX

Sujet : Typage de Legionella par Maldi Tof

Rémunération : À l'organisme (HCL)

Montant perçu (Organisme) : Total 10 000 euros

Période : 01/01/2019 - 31/12/2019

ORGENTEC

Sujet : Evaluation du réactif Legionella Monlab-Test® associé au lecteur SkanFlex

Rémunération : À l'organisme (HCL)

Montant perçu (Organisme) : Total 5 000 euros

Période : 09/2017 - 09/2018

3/5

BIORAD

Sujet : Utilisation de la ddPCR pour certifier un ADN standard

Rémunération : aucune

Période : 01/2017 - 01/2018

DIAGENODE

Sujet : R Dialeq clinical evaluation study on Genlead VIII

Rémunération : À l'organisme (HCL)

Montant perçu (Organisme) : Total 12 000 euros

Période : 02/2018 - 06/2019

BIOMERIEUX

Sujet : Etude de L. pneumophila par spectrométrie de masse

Rémunération : À l'organisme (HCL)

Montant perçu (Organisme) : Total 15 000 euros

Période : 31/12/2017 à aujourd'hui

SANOVI

Sujet : Evaluation de l'activité intracellulaire anti-Legionella d'une molécule

Rémunération : À l'organisme (HCL)

Montant perçu (Organisme) : Total 8 000 euros

Période : 05/2018 - 12/2018

BIORAD

Sujet : Evaluation of the supplement Free DNA Removal Solution (FDRS) step in the iQ-Check method

Rémunération : À l'organisme (Université Lyon 1)

Montant perçu (Organisme) : Total 3 500 euros

Période : 19/09/2018 - 31/12/2021

IDEXX

Sujet : Evaluation of Idexx Legiolert™. Comparison of Legiolert against the french standard NFT 90-431:2017 for the numeration of Legionella pneumophila from french potable water samples

Rémunération : À l'organisme (HCL)

Montant perçu (Organisme) : Total 8 000 euros

Période : 07/2017 - 08/2018

2.4. Rédaction d'article(s) et intervention(s) dans des congrès, conférences, colloques, réunions publiques diverses ou formations organisés ou soutenus financièrement par des entreprises ou organismes privés entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

2.4.1 Rédaction d'article(s)

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.4.2 Intervention(s)

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.5. Invention ou détention d'un brevet ou d'un produit, procédé ou toute autre forme de propriété intellectuelle non brevetée en relation avec le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

4/5

IN VITRO METHOD FOR DETECTING LEGIONELLA PNEUMOPHILA STRAIN RESISTANT TO FLUOROQUINOLONES ... FR3007770-A1

Structure : Université Joseph Fourier et CHU Grenoble

Intéressement : Non

Rémunération : aucune

Période : 01/2014 à aujourd'hui

3. Direction d'activités qui ont bénéficié d'un financement par un organisme à but lucratif dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiales, objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

4. Participations financières directes, sous forme d'actions ou d'obligations détenues et gérées directement ou de capitaux propres dans le capital d'une société dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiales, objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

5. Proches parents ayant des activités ou des intérêts financiers dans toute structure dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiales(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

6. Fonctions et mandats électifs exercés actuellement

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

7. Autre lien, dont vous avez connaissance, qui est de nature à faire naître des situations de conflits d'intérêts

ORGANISATION DU CONGRÈS EUROPÉEN ESGLI2018

Commentaire : Sponsoring du congrès par plusieurs sociétés : qmicro, Pall medical, Abott, Idexx, biocentric, sanipur, quidel, BioMérieux, BioRad

Période : 08/2018 - 08/2018

Déclaration Publique d'Intérêts

Le 22/05/2022 22:19:15

Je soussigné(e) **Descours Ghislaine**

Reconnais avoir pris connaissance de l'obligation de déclarer tout lien d'intérêts, direct ou par personne interposée, que j'ai ou ai eu au cours des cinq dernières années, avec les entreprises, établissements ou organismes dont les activités, les techniques et les produits entrent dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes au sein duquel/desquels j'exerce mes fonctions ou ma mission, ou de l'instance/des instances collégiale(s), commission(s), conseil(s), groupe(s) de travail dont je suis membre ou auprès duquel/desquels je suis invité(e) à apporter mon expertise, ainsi qu'avec les sociétés ou organismes de conseil intervenant dans les mêmes secteurs.

Il m'appartient, à réception soit de l'ordre du jour de chaque réunion pour laquelle je suis sollicité(e), soit de l'expertise que l'organisme souhaite me confier, de vérifier si l'ensemble de mes liens d'intérêts sont compatibles avec ma présence lors de tout ou partie de cette réunion ou avec ma participation à cette expertise. En cas d'incompatibilité, il m'appartient d'en avertir l'interlocuteur désigné au sein de l'institution et, le cas échéant, le président de séance avant sa tenue. En cas de conflits d'intérêts, ma présence est susceptible d'entacher d'irrégularité les décisions, recommandations, références ou avis subséquents et d'entraîner leur annulation.

J'indique mon numéro RPPS (répertoire partagé des professionnels de santé), si je suis un professionnel de santé : 10100184760

Je m'engage à actualiser ma DPI à chaque modification de mes liens d'intérêts. En l'absence de modification, je suis tenu(e) de vérifier ma DPI au minimum annuellement.

Article L. 1454-2 du code de la santé publique : « Est puni de 30 000 euros d'amende le fait pour les personnes mentionnées au I et II de l'article L. 1451-1 et à l'article L. 1452-3 d'omettre, sciemment, dans les conditions fixées par ce même article, d'établir ou de modifier une déclaration d'intérêts afin d'actualiser les données qui y figurent ou de fournir une information mensongère qui porte atteinte à la sincérité de la déclaration. »

1. Activité(s) principale(s), rémunérée(s) ou non, exercée(s) actuellement et au cours des 5 dernières années, à temps plein ou à temps partiel

Activité(s) salariée(s)

UNIVERSITÉ LYON 1

Adresse : 8 Avenue Rockefeller 69373 LYON 08 FRANCE

Fonction : Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Période : 01/11/2010 à aujourd'hui

2. Activité(s) exercée(s) à titre secondaire

2.1. Participation à une instance décisionnelle d'un organisme public ou privé dont l'activité, les techniques ou les produits entrent dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.2. Activité(s) de consultant, de conseil ou d'expertise exercée(s) auprès d'un organisme public ou privé entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.3. Participation(s) à des travaux scientifiques et études pour des organismes publics ou privés entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

2.3.1 Participation à des essais et études

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.3.2 Autres travaux scientifiques

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.4. Rédaction d'article(s) et intervention(s) dans des congrès, conférences, colloques, réunions publiques diverses ou formations organisés ou soutenus financièrement par des entreprises ou organismes privés entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

2.4.1 Rédaction d'article(s)

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.4.2 Intervention(s)

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2/3

2.5. Invention ou détention d'un brevet ou d'un produit, procédé ou toute autre forme de propriété intellectuelle non brevetée en relation avec le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

3. Direction d'activités qui ont bénéficié d'un financement par un organisme à but lucratif dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiales, objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

4. Participations financières directes, sous forme d'actions ou d'obligations détenues et gérées directement ou de capitaux propres dans le capital d'une société dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiales, objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

5. Proches parents ayant des activités ou des intérêts financiers dans toute structure dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

6. Fonctions et mandats électifs exercés actuellement

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

7. Autre lien, dont vous avez connaissance, qui est de nature à faire naître des situations de conflits d'intérêts

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique



PORTEUR DU PROJET : COSSET Francois-Loic (CSS5)

AVIS DE LA CSS5

Responsable d'équipe :

DOUBLET Patricia

Intitulé de l'équipe :

Pathogénèse des légionelles

REALISATIONS

Points forts :

113 publications (4,7/ETP/an) dont 35 en PDC (1,5/ETP/an)

2 publications dans le top10 des citations

Index citation normé 1,78

Parmi les découvertes importantes de la période : Caractérisation des facteurs de virulence sécrétés par le système de sécrétion de type 4.

Points à améliorer :

Aucune publication PDC dans journaux d'excellence de spécialité ou généralistes

POSITIONNEMENT INTERNATIONAL/NATIONAL

Points forts :

- Coordination d'une cohorte (essai PROGLEGIO : identification de marqueurs humains et bactériens de sévérité dans la légionellose)

- Collaboration avec l'équipe de X. Charpentier

- **Participation au Labex Ecofect («Ecology and evolutive biology of infectious diseases»)**

- **Participation à l'organisation du workshop du labex : "Evolution of infectious diseases: connecting ecological, molecular and computational approaches" en 2019**

- **Collaborations : G. Frankel (UK), E. Hartland (Australia), Parkhill J. (UK), C. Buchrieser (Institut Pasteur Paris) S. Jarraud.**

- Membre du comité exécutif du groupe Legionella de l'ECMID (ESGLI) comme trésorière

- Laboratoire expert du réseau européen de surveillance de Legionella (ELDSNet)

- S. Jarraud et F. Ader membres passées ou présent du CNU

Points à améliorer :

La participation à des réseaux de recherche européens pourrait être renforcée.

Deux cohortes coordonnées par l'équipe n'ont rien à voir avec la thématique (une tuberculose et une transplantation de cellules souches).

PROGRAMME

Points forts :

Programme dans la continuité sur l'étude des infections à Legionella avec mise à profit de la cohorte pour colliger des informations sur des marqueurs de sévérité cliniques et bactériologiques.

- Poursuite des travaux sur virulence (Dot/Icm et système de sécrétion de type 4)
- Déterminants bactériens de l'infection humaine à L. pneumophila (dont un axe collaboratif avec X. Charpentier, banque d'infections d'amibes par L. pneumophila)
- Déterminants bactériens de Légionelloses non ou lentement résolutive (persisters ?)
- Facteurs bactériens et microbiote associé à la sévérité de la Légionellose
- Facteurs environnementaux liés à la sévérité de la Légionellose (pollution, projet Wanted soutenu par programme Idex 2018)

Bénéfice de l'association avec le CNR Legionella et avec l'équipe de X. Charpentier.

Programme bien dimensionné par rapport à la taille de l'équipe et aux financements.

Points à améliorer :

Une grande partie du programme (points 2 à 5) est très spéculative sans hypothèse très précise. Peu de financements au-delà de 2020.

DIRECTION ET ANIMATION

Points forts :

Chef d'équipe depuis 2013.

Encadrements sur la période : 7 thèses, 8 M2, 1 post-doc.

Financements : 10 contrats depuis 2014.

Comme coordinateur : Finovi 110 KE, ANSES 193 KE, Labex ECOFECT 152 KE, + 182 KE, FRM 88 KE, CIRI 50 KE, ANR 245 KE.

Comme partenaire : IDEX wanted 230 KE.

Contrats industriels : BASF Beauty Helthcare solutions 46 KE, BioMerieux 36 KE (2 thèses CIFRE), FUI QAlcars (qualité de l'air habitat automobile 110 KE), SANOFI 8 KE.

Enseignement : 250 h enseignement/an.

Responsable de 3 modules de master en infectiologie.

Création en 2011 du parcours d'infectiologie fondamentale du master de biologie moléculaire et cellulaire (labellisé master d'excellence, erasmus).

Directrice adjointe département de biologie/UFR de biosciences Lyon1 et membre de comité pilotage école doctorale E2M2.

Vice-président commission 27 du CNRS.

Membre du JPIAMR

Equipe fondatrice Labex ECOFECT

Membre comité scientifique ou d'organisation Sympolegio 2013, 2015, journées Labex ECOFECT, congrès de l'ESGLI 2018.

Reviewer 3 grants internationaux.

Jury : 14 recrutements MCU ou PU, 17 thèses, 3 HDR.

Points à améliorer :

Pas de financements internationaux ;
Pas de mentions de conférences invitées.

AVIS GLOBAL

Bonne équipe. Bon niveau de publication.
Les financements compétitifs internationaux pourraient être recherchés pour essayer d'élever le niveau des publications et la reconnaissance internationale.

Annexe 4. Evaluation de l'équipe de recherche *Legionella* pathogenesis par l'HCERES (CSS7)

International Center for Infectiology Research, CIRI, U Lyon 1, ENS Lyon, Inserm, CNRS, Mr François-Loïc Cosset



TEAM 5

Legionella Pathogenesis (LegioPath)

TEAM 5 LEADER

Ms Patricia Doublet / Ms Sophie Jarraud

TEAM 5 SCIENTIFIC DOMAIN

The team works on *Legionella pneumophila*, a major lung pathogen and the agent of Legionnaires Disease (LD), a potentially fatal pneumonia. The team aims to characterize bacterial, host, and environmental determinants of acquisition and severity of LD. Specifically, the team studies both molecular mechanisms of bacteria-host cell interaction, physiopathology of LD in sophisticated infection models and clinical microbiology of LD. In collaborative projects also, environmental parameters such as disease development by pollution are considered.

TEAM'S 5 RESPONSE TO PREVIOUS RECOMMENDATIONS

The main recommendation from the previous evaluation was to continue the effort of unification (carried out in January 2013) of the originally two teams, consisting of the group of P. Doublet and the clinical microbiology and reference center directed by S. Jarraud and to prove that collaborative efforts add research expertise. The recommendations were addressed by the geographic gathering of the groups at the La Doua site, the sharing access to biological and clinical resources, the joint projects and common publications, obtaining a grant at the interface between basic and clinical microbiology from ANR/DGOS ProgLegio, and gaining higher national and international visibility. The recommendations were accordingly fulfilled and are especially visible in the joint publications (at least five). Therefore, the team has considered and well implemented the recommendations of the previous evaluation report.

TEAM 5 WORKFORCE

Legionella Pathogenesis (LegioPath)		
Active staff	Number 06/30/2019	Number 01/01/2021
Full professors and similar positions	3	3
Assistant professors and similar positions	4	4
Full time research directors (Directeurs de recherche) and similar positions	0	0
Full time research associates (Chargés de recherche) and similar positions	1	1
Other scientists ("Conservateurs, cadres scientifiques des EPIC, fondations, industries, etc.")	0	0
High school teachers	0	0
Supporting personnel (ITAs, BIATSSs and others, notably of EPICs)	3	3
Permanent staff	11	11
Non-permanent professors and associate professors, including emeritus	0	
Non-permanent full time scientists, including emeritus, post-docs (except PhD students)	1	
PhD Students	4	
Non-permanent supporting personnel	1	
Non permanent staff	6	
Total	17	11

49

The research topic of the LegioPath team includes 1) analysis of bacterial determinants in Lpn virulence, such as the role of typeIVB effectors and the type I secretion system on Lpn and 2) bacterial and host determinants in emergence and severity of LD, including the analysis of especially virulent Lpn clones.

The LegioPath team published articles on Legionella on regular basis; in total 28 research articles, with 16 as first/last authors, and five reviews. Two articles with lead position appear in highly ranked journals, such as *MBio* (about a Dot/Icm effector and its role in inhibition of actin polymerization and late endosome trafficking) and *Clin Inf Dis* (about cases and review literature with respect to the phenomenon of non-resolving LD and show that rarely, LD can progress into a slowly or non-resolving form). Further publications were on a collaborative base, for example *Genome Research*, *PNAS*, *Emerg Inf Dis*, and *Clin Inf Dis*. Additionally, very promising study results are currently under revision in a high-profile journal.

The team was successful in academic grant applications especially at the national level, for example a LabEx Ecofect grant was acquired as a coordinator and an ANR PRTS ProgLegio grant but no international grants were obtained. Members of the team acquired a variety of prizes or distinctions (such as 4 Prime d'excellence scientifique/Prime d'encadrement doctoral et de Recherche).

The team is internationally visible due to the publications and they were invited to give presentations at international meetings, such as the ESCMID meeting 2018 in Madrid, or presented as a speaker at the Legionella conference in Rome, 2017, which is organized every four years. Furthermore, the team organized eight meetings or symposia out of France. This included the organization of the 5th European Congress ESGLI in 2018, and of the 4th national meeting SympoLegio in 2015.

During the evaluation period, two post-docs (one ongoing) worked in the team and among them one for more than two years. The group hosted 5 visiting scientists from Germany (2), The Netherlands (1) and Sweden (2). The duration of stay at CIRI was from about ~ 2 weeks until ~ three months. In that context, a publication on *L. anisa* resulted from the interaction with the group of Prof. A. Friedrich from the Netherlands.

Weaknesses

Team visibility is medium leveled when measured by journal reviewing activities and also co-authored manuscripts of the non-clinical topics. Article reviewing activities compared to senior team member publication history appear surprisingly low for the five-year period but lots of activities are found concerning grant applications and thesis reviewing. Although good quantity of published manuscripts (53 papers of which 28 as lead authors), the impact of the journals chosen on average is medium-leveled.

Assessment of scientific outputs, reputation and appeal

The assessment of scientific outputs, reputation and appeal are very good to excellent.

B – Interactions with the non-academic world, impacts on economy, society, culture or health

From 01/01/2014 to 06/30/2019	Team 5
	LegioPath
Socio-economic interactions / patents	
Invention disclosures	0
Filed patents	0
Accepted patents	0
Licensed patents	0
Socio-economic interactions	
Industrial and R&D contracts	5

Participation in editorial committees (books, collections, etc.)	5
Collection and series management	0
Reviewing activities	
Reviewing of articles	68
Grant evaluation (public or charities)	92
Reviewing of research institutes	6
Participation in institutional committees and juries (CNRS, Inserm, etc.)	8
Academic research grants	
European (ERC, H2020, etc.) and international (NSF, JSPS, NIH, World Bank, FAO, etc.) grants – coordination	0
European (ERC, H2020, etc.) and international (NSF, JSPS, NIH, World Bank, FAO, etc.) grants – partnership	0
Other European grants - coordination	0
Other European grants - partnership	0
National public grants (ANR, PHRC, FUI, INCA, etc.) - coordination	2
National public grants (ANR, PHRC, FUI, INCA, etc.) - partnership	2
Local grants (collectivités territoriales) - coordination	4
Local grants (collectivités territoriales) - partnership	0
PIA (labex, equipex etc.) grants - coordination	0
PIA (labex, equipex etc.) grants - partnership	1
Grants from foundations and charities (ARC, FMR, FRM, etc.) - coordination	1
Grants from foundations and charities (ARC, FMR, FRM, etc.) - partnership	0
Visiting senior scientists and post-docs	
Post-docs (total number)	2
Foreign post-docs	0
Visiting scientists (total number)	5
Foreign visiting scientists	5
Scientific recognition	
Prizes and/or distinctions	4
IUF members	0
Chair of learned and scientific societies	2
Organisations of meetings and symposia (out of France)	8
Invitations to meetings and symposia (out of France)	11
Members' long-term visits abroad	1

Strengths

The LegioPath team works on the highly relevant bacterial lung pathogen *L. pneumophila* and associated Legionnaires disease. The close relationship to the Legionella reference centre (managed by one PI) is a great opportunity to use a variety of clinical strains and stress wider applicability of the findings.

The research topic of the LegioPath team includes 1) analysis of bacterial determinants in Lpn virulence, such as the role of typeIVB effectors and the type I secretion system on Lpn and 2) bacterial and host determinants in emergence and severity of LD, including the analysis of especially virulent Lpn clones.

The LegioPath team published articles on Legionella on regular basis; in total 28 research articles, with 16 as first/last authors, and five reviews. Two articles with lead position appear in highly ranked journals, such as *MBio* (about a Dot/Icm effector and its role in inhibition of actin polymerization and late endosome trafficking) and *Clin Inf Dis* (about cases and review literature with respect to the phenomenon of non-resolving LD and show that rarely, LD can progress into a slowly or non-resolving form). Further publications were on a collaborative base, for example *Genome Research*, *PNAS*, *Emerg Inf Dis*, and *Clin Inf Dis*. Additionally, very promising study results are currently under revision in a high-profile journal.

The team was successful in academic grant applications especially at the national level, for example a LabEx Ecofect grant was acquired as a coordinator and an ANR PRTS ProgLegio grant but no international grants were obtained. Members of the team acquired a variety of prizes or distinctions (such as 4 Prime d'excellence scientifique/Prime d'encadrement doctoral et de Recherche).

The team is internationally visible due to the publications and they were invited to give presentations at international meetings, such as the ESCMID meeting 2018 in Madrid, or presented as a speaker at the Legionella conference in Rome, 2017, which is organized every four years. Furthermore, the team organized eight meetings or symposia out of France. This included the organization of the 5th European Congress ESGLI in 2018, and of the 4th national meeting SympoLegio in 2015.

During the evaluation period, two post-docs (one ongoing) worked in the team and among them one for more than two years. The group hosted 5 visiting scientists from Germany (2), The Netherlands (1) and Sweden (2). The duration of stay at CIRI was from about ~ 2 weeks until ~ three months. In that context, a publication on *L. anisa* resulted from the interaction with the group of Prof. A. Friedrich from the Netherlands.

Weaknesses

Team visibility is medium leveled when measured by journal reviewing activities and also co-authored manuscripts of the non-clinical topics. Article reviewing activities compared to senior team member publication history appear surprisingly low for the five-year period but lots of activities are found concerning grant applications and thesis reviewing. Although good quantity of published manuscripts (53 papers of which 28 as lead authors), the impact of the journals chosen on average is medium-leveled.

Assessment of scientific outputs, reputation and appeal

The assessment of scientific outputs, reputation and appeal are very good to excellent.

B – Interactions with the non-academic world, impacts on economy, society, culture or health

From 01/01/2014 to 06/30/2019	Team 5
	LegioPath
Socio-economic interactions / patents	
Invention disclosures	0
Filed patents	0
Accepted patents	0
Licensed patents	0
Socio-economic interactions	
Industrial and R&D contracts	5

Cifre fellowships	2
Creation of labs with private-public partnerships	0
Networks and mixed units	0
Start-up	0
Clinical trials	3
Expertise	
Consulting	24
Participation in expert committees (ANSES etc.)	2
Legal expertise	2
Expert and standardization reports	1
Public outreach	
Radio broadcasts, TV shows, magazines and newspapers	0
Journal articles, interviews, book edition, videos, other popularization outputs, debates on science and society, etc.	5

Strengths

LegioPath and particularly its clinical and reference center work involves a topic of great interest for the industry and for public health, therefore it is suited for intense interaction with the industry and the public.

Five industrial and R&D contracts were achieved. Specifically, 2013-2014 BASF Beauty Care Solutions: Studying Microbiota Competition and Skin Interaction Using Organotypic 3D Skin Models, 2016-2020 FUI21 (« Fonds unique interministériel »), QAlcars project with many partners, 2010-2016 bioMérieux: "Reductases activities as marker of bacteria species and growth to use in diagnostic assays" Partnership and 2 PhD thesis in co-direction (CIFRE contracts), 2018 - 2019 BioRad: Evaluation of the supplement Free DNA Removal Solution (FDRS) step in the iQ-Check method and 2018: SANOFI-AVENTIS R&D: Study of antibiotic activity of one molecule on 2 Legionella infection models: Legionella/macrophages and Legionella/amoeba.

Furthermore, two PhD candidates could be financed (CIFRE) and three clinical trials, such as the TB study group or PROGLEGIO, a study analyzing bacterial and human biomarkers of prognostic value for LD.

A variety of consulting took place, such as training of staff concerning bacteriology and host-bacteria interactions for companies, and participations in expert committees, such as the ECDC contact point – laboratory expert for LD and nomination as director of a national reference center. Several activities with public outreach took place, such as at the INSERM program about team research on LD.

Weaknesses

Currently a variety of activities exists especially with respect to industrial connection and reference work but did not yet result in invention disclosures or patents.

Assessment of the interactions with the non-academic world

Assessment of the interactions with the non-academic world is very good to excellent.

C – Involvement in training through research

From 01/01/2014 to 06/30/2019	Team 5
	LegioPath
Educational outputs	
Books	5
E-learning, MOOCs, multimedia courses, etc.	1
Scientific productions (articles, books, etc.) from theses	
Scientific productions (articles, books, etc.) from theses	17
Mean number of publications per student	2,4
Training	
Habilitated (HDR) scientists	5
HDR obtained during the period	2
PhD students (total number)	13
PhD students benefiting from a specific doctoral contract	8
Defended PhDs	7
Mean PhD duration	40
Internships (M1, M2)	28
People in charge for a mention or a master's degree course (total number)	2
People in charge for a mention or a master's degree course with international certification (Erasmus mundus)	1

Strengths

Almost all permanent staff (5 HDR) has a high teaching load (some up to 200h/250h/year) at university clinical levels. Furthermore, public health-related responsibilities that are likely not being included in the presented position equivalents but shows the multifaceted involvement of the team in addition to research activities. They also trained 13 PhD students with non-permanent contracts. In principal, these numbers represent a very good basis for a research group.

As a University institute it is only consequent that the team is mostly staffed by the University. Therefore, the team has a certain teaching obligation that lies on the average of European universities and, which results in a strong involvement in training for and through research.

The team trained 13 PhD students and 7 have completed their thesis during the period under evaluation. The average time for thesis completion with 40 months is a little long but still acceptable. The PhD student training is of good level, all PhD students except one (defense in 2016) published their work as first authors. Some PhD students have 3 or 4 first author publications (*Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *BMC Microbiol.*, *Clin Microbiol Infect.*). One PhD student published as first author in *mBio*, a high impact journal. Eight/Nine PhD students were on a specific contract, such as, Ministry doctoral contract (5), 1 CIFRE contract, and LabEx Ecofect Contract (2) and a Lebanese contract.

Two persons of the team obtained habilitation during the evaluation period. The team supervised 28 M1 and M2 students. The Master workshops of the team are electronically available on a local basis.

Several PIs have also external academic responsibilities, and serve the University of Lyon and its scientific community including the on-going reorganization of the University of Lyon, as well as teaching activities at ENS Lyon and UCBL. One PI is co-head of the Master research program in Infectious diseases, UCBL, and this program led 2013 to the creation of the international ERASMUS MUNDUS "LIVE" (Leading International Vaccinology Education) Master research program which receives support of the Erasmus+ Programme of the European Union.

One PI also fulfills a number of important organizational tasks that are very important for the function and the image of the institute (member of executive committee CIRI). She is deputy-director of the "Biology Department/UFR BioSciences" of UCBL since 2016; and two PIs are members of the council of the Biology department/UFR BioSciences of UCBL. Two scientists are also members of an international committee for hiring students of Master Erasmus mundus LIVE. This assures direct contact to the students which is reflected by the attractiveness of the team for students and researchers.

The senior researchers share training of PhD students among each other. It is very positive that students are trained in a highly interdisciplinary atmosphere, because the team unifies a unique and optimal linkage of clinical, public health and basic research expertise since its gathering from previously two independent groups in the beginning of 2013. The team has a high visibility for attraction of permanent scientist positions (three since 2013). Lab meetings for extensive presentation of experimental data are organized once per month and meetings with the horigene group once per week.

Weaknesses

For 5 HDR, the number of PhD thesis defenses (7) is quite low, for the 5-year period. But 6 PhD theses are still ongoing. No foreign PhD students were hosted.

It might be a challenge to organize communication within the group or assemble the members for a common meeting regularly since almost all senior scientists have considerable teaching loads or substantial clinical/public health or academic leadership (e.g., various committees) responsibilities. Lab meetings once per months seem to be quite rare.

Assessment of the involvement in training through research

Involvement in training through research is excellent.

CRITERION 2: TEAM 5 ORGANISATION AND LIFE

Not evaluated at the team level.

CRITERION 3: FIVE-YEAR PROJECT AND STRATEGY FOR TEAM 5

Strengths

The main goal of the team is to characterize the bacterial, host and environmental determinants of the acquirement and the severity of legionellosis. They are developing an integrated strategy from the study of molecular mechanisms of bacteria-host cell interactions, physiopathology of LD in a lung-on-a-chip model to clinical microbiology of human LD. This is a very conclusive direction of research over the next 5 years.

Topic 1 will include the analysis of c-di-GMP signaling and translocation control and analysis of the role of protein-kinase effectors LegK1-LegK4 in virulence. The panel finds the LegK topic of higher potential to lead to substantial results in the next research period. Topic 2 comprises 3 approaches where the tn insertion strategies and the GWAs approach seem most promising. The 3rd topic aims to find the determinants for bacterial persistence by means of a tn seq approach which is of high scientific interest but also very challenging with respect to the applied methods. The fourth topic involves a very comprehensive study where conclusions about the human genetic and immunologic factors for LD severity will be extracted. In addition, in cooperation with C. Buchrieser the effect of microbiota will be determined. The fifth topic investigates the impact of fine particles exposure on the risk to develop and on the severity of LD.

There is a good basis for the anticipated work by the present highly qualified team members which have broad expertise in the fields of clinical, public health and basic research on Legionella infections. The team has successfully acquired funding (collaborator in ANR PRIM-TB (ending 2022, and in IDEX WANTED, ending 2021) and the cooperation with the horigene and other CIRI groups is beneficial.

Weaknesses

The research plan is very ambitious and involves a broad array of themes which may include too many subdirections to follow for a team with a variety of other tasks than research. We see some weaknesses in the research plan:

Although the c-di-GMP topic as outlined above is interesting, it might not be easy to find the functional link to effector translocation. Furthermore, topic 3 may be a very competitive since the recent publication on occurrence of persistent Lpn populations by the group of Hubert Hilbi. Nevertheless, there is less competition to expect when the screen will be done in different clinical strains. Indeed, the team already initiated a cooperation with H. Hilbi.

The question arises how the manpower with respect to the PhD students will be maintained over the five-year period and how the costs for consumables will be covered for the project parts.

Specific funding for only two of the anticipated five research topics were mentioned in the research plan (III -> "Wanted" project funded by IDEX breakthrough program in 2018 and V -> CIRI Intramural call in 2017).

The team mentioned as a threat to their work the upcoming building renovation which is followed by a further move. This interruption of the wet lab work indeed endangers the successful continuation of the work.

Assessment of the scientific strategy and projects

The assessment of the scientific strategy and projects is very good to excellent.

RECOMMENDATIONS TO THE TEAM 5

A – Recommendations on scientific production and activities for the team 5 (criterion 1)

The team mostly acquired a variety of national grants. The team therefore should try to get EU grants, which seems possible with the proposed topic and objectives.

The team should try to pursue activities especially with respect to invention disclosures and patents in the future.

The number of PhD defenses (5 HDRs in the team) may be increased as well as the visibility of the team.

It may be beneficial for a team with many different tasks to organize team meetings within LegioPath on a more frequent basis than once a month.

B – Recommendations on the team's 5 organisation and life (criterion 2)

Not evaluated at the team level.

C – Recommendations on scientific strategy and projects for the team 5 (criterion 3)

Although the topics addressed are complementary, they are quite broad ranging from basic clinical aspects to very specialized mechanistic analysis of secreted effectors. Furthermore, additional work on pathogens is appearing in the publication list, including non-tuberculous Mycobacterial infection in a clinical study and also Enterococcus faecalis enzymes. Both are scientifically interesting and important but they withdraw workforce from the main line of the projects.

It seems therefore beneficial for the future research in the LegioPath team to prioritize the goals and concentrate their workforce to a reduced number of questions/approaches, especially to those providing optimal and mutual interactions within the group and the CIRI.

Bioinformatic expertise would essentially complement the group's expertise.

Annexe 5. Précisions sur l'investigation des cas groupés de légionellose de 2017 à 2020

Cas groupés de 2017 :

- Cas groupés dans l'Hérault

L'ARS a déclaré une sur-incidence de cas de légionellose dans l'Hérault avec une première alerte suite à la déclaration de 4 cas entre le 21/12/2016 et le 01/01/2017, chez des personnes résidant dans le quartier Gambetta de Montpellier. Au total 18 cas relatifs à cette situation ont été retenus entre mi-décembre 2016 et juillet 2017. L'analyse des expositions potentielles des cas a montré que 8 cas (dont 5 survenus en juillet), faisaient partie de la patientèle d'un même cabinet de kinésithérapie, dont l'expert en génie climatique missionné par l'ARS pour intervenir dans le cabinet de kinésithérapie. Parmi les 8 cas, 4 ont eu des séances de balnéothérapie précédées et/ou suivies de douche et 3 n'en ont pas eu. L'expert a manipulé l'ensemble des installations sans port d'équipement de protection individuelle. L'analyse des trajets urbains des dix autres cas atteints de légionellose mais n'ayant pas fréquenté le cabinet de kiné durant les 14 jours d'incubation possible de leur maladie relève pour 6 cas, un ou plusieurs passages hebdomadaires sur le cours Gambetta où se situe le cabinet. Les 4 autres cas ont fréquenté le quartier. Parmi les dix cas qui n'ont pas eu de soins dans le cabinet de kinésithérapie, un cas habite à l'étage supérieur du cabinet.

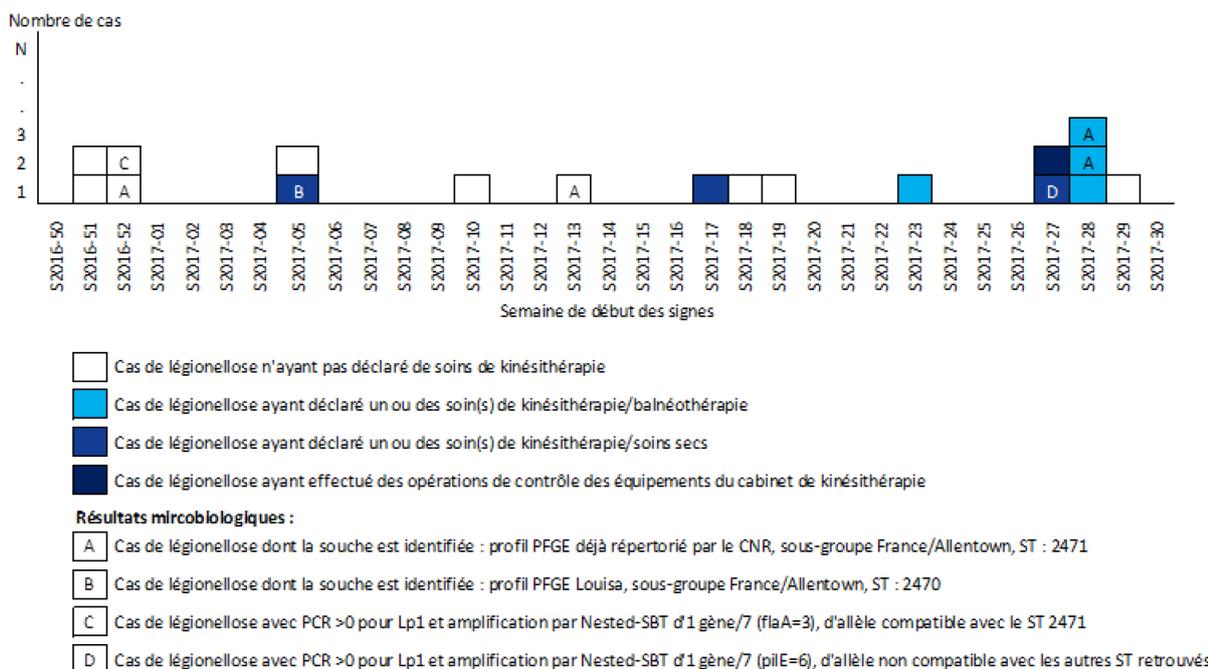


Figure 376. Courbe épidémique des cas de légionellose en fonction du début des signes cliniques

L'investigation du cabinet de kiné a mis en évidence des anomalies sur le réseau d'eau chaude sanitaire (températures insuffisantes), des désordres (fuites) autour des équipements de la piscine, et l'absence d'entretien d'une installation de pompe à chaleur air-air avec circuit d'eau secondaire et cassettes réfrigérantes, qui climatise et chauffe l'ensemble des locaux. L'arrêt de la pompe à chaleur a été demandé par l'ARS le 12 mai 2017 puis un arrêt complet des installations le 12 juillet 2017. De plus les investigations *in situ* ont permis de constater que la bouche d'extraction de la pompe à chaleur et l'aération du local technique du cabinet débouchaient sur la terrasse du patient domicilié dans l'immeuble. Ces constatations sont des arguments en faveur d'une source commune localisée dans le cabinet de kinésithérapie avec une exposition simultanée de la patientèle et des riverains et passants.

L'enquête environnementale a ainsi permis de confirmer le cabinet de kinésithérapie comme source d'infection avec des souches environnementales identiques à 5 souches cliniques disponibles. Pour un des patients, l'eau chaude sanitaire dans une résidence pour personnes âgées a pu être identifiée comme source de l'infection.

Ce cas groupé est atypique pour 2 raisons : (1) un centre de kinésithérapie est responsable de cas chez des personnes n'ayant pas fréquenté l'établissement ; (2) au niveau microbiologique deux souches étaient présentes au niveau de la source de contamination, les patients se sont contaminés par l'une ou par l'autre de ces deux souches (ce qui est rarement observé).

- **Cas groupés nosocomiaux à Martigues**

Une déclaration de 4 cas nosocomiaux de légionellose entre juin et octobre 2017 au CHU de Martigues a été faite par l'ARS. Cet établissement avait déjà fait l'objet d'une enquête pour 2 cas de légionellose en 2014 et un cas en 2009. La comparaison des souches cliniques avec des souches environnementales isolées dans deux services en 2017 ainsi que d'une souche isolée en 2009 a permis de montrer des souches identiques de type endémique Paris, ST1.

L'analyse par NGS a permis de confirmer le caractère nosocomial de ces 7 cas de légionellose diagnostiqués entre 2009 et 2017 ; les isolats appartiennent tous au même cluster et partagent le même ancêtre commun le plus récent. Des mesures correctives au niveau du réseau d'eau ont été mises en place.

- **Suspicion de cas groupés de légionellose en Seine-Saint-Denis**

Au cours du mois de juillet 2017, 11 cas de légionellose à *Legionella pneumophila* sérotype 1 sont survenus chez des résidents du nord et du centre du département de la Seine-Saint-Denis. Cette augmentation marquée de cas n'était pas observée ailleurs en Ile-de-France et suggérait une possible source commune de contamination environnementale localisée dans le département.

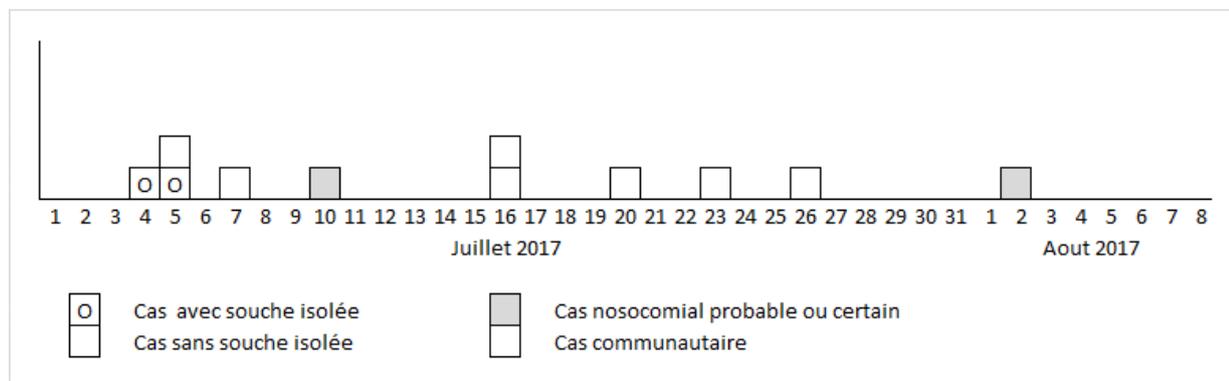


Figure 387. Courbe épidémique des cas de légionellose en fonction de la date de début des signes (n=11).

Sur ces 11 cas, 2 étaient des cas nosocomiaux probables ou certains. Le CNR a reçu 6 prélèvements ce qui a permis d'isoler 5 souches cliniques pour ces patients. Cependant aucune souche n'était identique, ce qui n'est pas en faveur d'une source commune de contamination. Une enquête environnementale sur des TARs environnantes a permis d'isoler des souches de *Legionella pneumophila* qui étaient également différentes de celles des patients. Au final, aucun lien épidémiologique entre les patients n'a pu être mis en évidence et aucune surincidence n'a été observée depuis.

- **Suspicion d'épidémie de fièvre de Pontiac liée à une exposition environnementale des salariés de l'usine Clarebout Potatoes à Neuve Eglise (Belgique)**

Epidémie de 127 cas de syndromes pseudogrippaux au sein de l'usine Clarebout Potatoes ayant touché 76 Français et 51 Belges. Le 26/07/2017, le service des urgences du CH Armentières signalait à l'ARS Hauts-de-France l'admission de 7 personnes présentant un syndrome pseudo-grippal avec altération de l'état général, asthénie, hyperthermie jusqu'à 41°C, douleurs abdominales et vomissements pour une personne. Les examens biologiques standards retrouvaient des marqueurs de syndrome inflammatoire (CRP >100, élévation de la PCT) associé à une perturbation de la NFS (hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles). Les radiographies thoraciques effectuées ne présentaient pas d'anomalie. Ces personnes avaient toutes pour point commun de travailler dans la section réception, tri, nettoyage des pommes de terre au sein de l'entreprise Clarebout Potatoes sur le site de Neuve Eglise (Nieuwkerk), situé à la frontière franco-belge en Belgique. L'entreprise emploie près de 90% de français. L'analyse des premiers éléments cliniques et épidémiologiques et d'exposition rapportés par les patients était compatible avec l'hypothèse d'une épidémie de fièvres de Pontiac. Le fait qu'aucun cas secondaire n'ait, à ce jour, été identifié dans l'entourage familial des cas survenus chez les salariés de l'usine, est en faveur d'une exposition environnementale des salariés à un agent non transmissible à durée d'incubation moyenne courte (24-48 heures), au sein de l'entreprise. La courbe basée sur la date de passage aux urgences (n=74) est marquée par un début très brusque le mercredi 26 juillet et une augmentation modérée sur les 2 jours suivants. Le pic atteint le jeudi 28 est suivi d'une baisse franche régulière sur les jours suivants. Les derniers cas ont été signalés le 3/08 (2 cas). La majorité des patients sont sortis après quelques heures d'observation et des prescriptions de traitements symptomatiques et antipyrétiques. Les recherches de virus grippaux, et antigénurie légionelle et pneumocoque sont toutes négatives. L'AVIQ (Belgique) a réalisé des prélèvements environnementaux, notamment sur le réseau d'eau de l'usine et les tours aérorefrigérantes. Cependant, l'entreprise a effectué une désinfection des lieux ce qui a diminué les chances de retrouver des bactéries, en particulier les légionelles sur le site. Des résultats

de recherche par PCR de *Legionella* sont revenus positifs mais les taux ont été jugés "non décisifs" par les autorités belges.

Des sérologies ont été réalisées pour les patients ainsi que dans certains cas des prélèvements nasopharyngés ou respiratoires bas. Le CNR-L a reçu des prélèvements pour 73 patients Français :

- Echantillons « respiratoires » (7), 3 expectorations et 4 aspirations nasopharyngées ou écouvillons de gorge : La culture a été positive pour un échantillon (crachat) à *Legionella bozemanii*. Les autres cultures sont négatives. La PCR *Legionella* spp et *L. pneumophila* a été réalisée sur 6 échantillons « respiratoires ». La PCR *Legionella* non *pneumophila* a été positive pour 3 échantillons, dont une PCR positive à *Legionella bozemanii* qui correspond au prélèvement positif en culture.

- Sérologie (123 sérums, 73 patients) : la sérologie *L. pneumophila* a été réalisée par ELISA ou IF ; la sérologie *L. non pneumophila* a été réalisée par IF pour les espèces *L. anisa*, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumofii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. longbeachae* pour l'ensemble des 123 sérums.

- 105 sérums montrent un résultat négatif : titre \leq à 64 pour toutes les espèces

- 18 sérums montrent un titre \geq 128 pour au moins une des espèces.

L'existence de réactions croisées en sérologie entre les différentes espèces est connue. Le titre en *L. bozemanii* est augmenté pour tous ces sérums, seul ou associé à d'autres espèces ; de plus le titre en *L. bozemanii* est souvent le plus élevé. Ces résultats associés à la mise en culture de *L. bozemanii* à partir d'un prélèvement pulmonaire pour un patient sont en faveur de cette espèce comme agent pathogène. Néanmoins les résultats de sérologie ne permettent pas d'écarter une contamination par plusieurs *Legionella non pneumophila* voire *L. pneumophila* séro groupe 4.

Au total, pour 18 patients une infection par *L. bozemanii* peut être évoquée

- 1 patient avec une souche *L. bozemanii* isolée
- 2 patients avec une PCR *L. non pneumophila* positive
- 12 patients avec une séroconversion en *L. non pneumophila*, dont *L. bozemanii*
- 3 patients ayant des titres élevés répétés en *L. non pneumophila*, dont *L. bozemanii*

Pour 2 patients, des titres élevés en *L. pneumophila* séro groupe 4 ont été observés (1 autre patient montre une séroconversion en Lp4 et *L. bozemanii*).

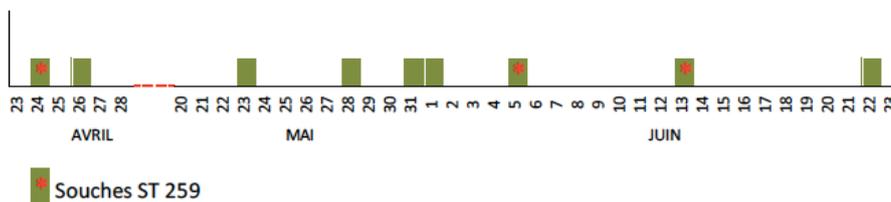
Le CNR de Belgique nous a envoyé un échantillonnage de 32 sérums issus de 16 patients (testé négatif en *L. pneumophila* par le CNR Belge) pour analyser les *L. non pneumophila*. Les résultats étaient similaires : 6 séroconversions en *L. non pneumophila* ; 2 titres élevés en *L. non pneumophila* et 1 séroconversion en *L. pneumophila* séro groupe 4 (1/256) (associé à une séroconversion en *L. non pneumophila*). L'espèce *L. bozemanii* était toujours positive.

Cette épidémie est la première épidémie décrite de fièvre de Pontiac en France. La mise en culture d'une *Legionella* (ici *L. bozemanii*) est exceptionnelle au cours de fièvre de Pontiac caractérisée par l'absence de pneumonie (ce qui était le cas pour la patiente). Cet isolement a été possible grâce à la préconisation de réaliser un prélèvement en systématique même en absence de symptomatologie pulmonaire. Une demande de prélèvement devrait être plus systématique dans le cadre de fièvre de Pontiac. La PCR a par ailleurs permis la mise en évidence d'ADN de *L. non pneumophila* pour 2 autres prélèvements. Ce prélèvement pulmonaire positif a été d'une grande utilité pour cibler les sérologies réalisées.

Cas groupés de 2018 :

- **Episode de cas groupés de légionellose dans l'agglomération de Clermont-Ferrand**

Le département du Puy-de-Dôme (63) a fait partie des départements les plus concernés par la recrudescence des cas de légionellose observée dans la région Auvergne-Rhône-Alpes en mai-juin 2018. Au 5 juillet 2018, le nombre de cas signalés depuis le début de l'année (n=27) était déjà supérieur au nombre de cas pour l'année 2017 (n=24, dont 9 sur la période fin avril-juin) (cf courbe épidémique ci-dessous, d'après E. Vaissière, Cire ARA).



Courbe épidémique réalisée à partir des dates de début des signes des cas « clermontois » déclarés sur la période avril-juin 2018

Parmi ces 27 cas domiciliés dans le Puy-de-Dôme :

- 14 ont été notifiés par le CHU de Clermont-Ferrand ;
- 13 résidaient dans l'agglomération (Clermont-Ferrand, Chamalières, Gerzat, Cournon-d'Auvergne) ;
- 2 s'étaient rendus au moins une fois dans la commune de Clermont-Ferrand.

Trois autres patients, non domiciliés dans la région ARA, avaient effectué un séjour dans l'agglomération de Clermont-Ferrand.

L'isolement d'une souche clinique a été obtenu pour 3 cas domiciliés à Clermont-Ferrand. Les 3 souches présentaient un ST259. Le WGS de ces souches a montré que 2 de ces souches appartenaient au même cluster, compatible avec une origine de contamination commune. L'enquête de l'ARS n'a pas retrouvé de lieu fréquenté en commun entre ces patients. Une autre souche, ST 23, a été isolée chez un patient domicilié à Chamalières.

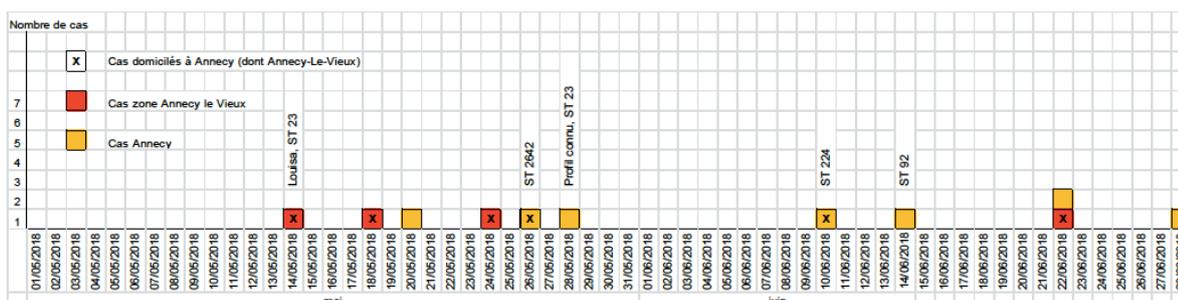
Les lieux de déplacement des cas ont été recensés de manière systématique par l'ARS pour tout cas de légionellose à l'aide d'un questionnaire standardisé. Leur analyse n'a révélé aucune zone, plus restreinte que l'agglomération elle-même, commune à l'ensemble des cas depuis début 2018. En revanche, elle a mis en évidence plusieurs regroupements de quelques cas, que ce soit au travers des lieux fréquentés ou des lieux de domicile, et en particulier la commune de Chamalières.

Initialement centrées sur le secteur de Chamalières, les investigations menées par l'ARS se sont progressivement élargies à l'agglomération clermontoise, au fur et à mesure de l'apparition de nouveaux cas. La DREAL (Direction régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) a fourni à l'ARS les résultats d'autocontrôle des Tars présentes sur ce secteur mais ces Tars de Clermont-Ferrand n'ont pas fait l'objet de prélèvements inopinés. Ils ont révélé des dépassements du seuil de détection (1000 UFC/L) sur 3 sites en mai 2018 ; les souches de Lp1 isolées au niveau d'une Tar ont été adressées au CNR pour comparaison avec les souches cliniques mais elles ont montré un profil différent (ST1). De nombreuses actions ont été menées par l'ARS parallèlement dans les communes de Chamalières et Clermont-Ferrand : prélèvements aux domiciles de 3 cas domiciliés à Chamalières, recensement ± suivi/contrôle des fontaines publiques et dispositifs susceptibles de générer des microgouttelettes d'eau, information des supermarchés de l'agglomération (n=10) concernant leurs systèmes de brumisation, inspection de la piscine de Chamalières ayant révélé plusieurs manquements (méconnaissance de la réglementation de 2010, eau froide sortant chaude, absence de relevés de température etc). Cependant, aucune de ces investigations n'a mis en évidence la présence de légionelles.

Au total, malgré le nombre important de cas groupés sur la commune de Clermont-Ferrand en mai-juin 2018, peu de prélèvements broncho-pulmonaires ont été réalisés ; une sensibilisation auprès des praticiens hospitaliers doit être poursuivie. Enfin, une attention particulière sera portée à tout nouveau cas de légionellose de type ST259 à Clermont-Ferrand.

• Episode de cas groupés de légionellose sur la commune d'Annecy

Entre le 14 mai et le 30 juin 2018, 11 cas domiciliés (n=6) ou s'étant déplacés à Annecy ou Annecy-Le-Vieux (n=5) ont été notifiés (cf courbe épidémique ci-dessous, d'après J.M. Yvon, Cire ARA).



L'ensemble des cas a été interrogé pour identifier les expositions à risque à leur domicile et lors de leurs déplacements. Plusieurs cas ont également été réinterrogés par téléphone pour affiner leurs déplacements dans le secteur. En dehors des 4 cas résidant à Annecy-Le-Vieux, aucune autre zone commune restreinte fréquentée par l'ensemble des 11 cas ou par quelques-uns d'entre eux n'a été identifiée. Des investigations poussées ont été réalisées par l'ARS sur la zone restreinte d'Annecy-Le-Vieux où sont domiciliés les 3 premiers cas signalés ; aucune source de contamination compatible avec les cas n'a été identifiée.

Concernant les investigations microbiologiques, un prélèvement broncho-pulmonaire a été obtenu pour 9 cas, et 5 souches cliniques ont été isolées. Les 5 cinq souches présentaient toutes des ST et/ou des profils PFGE différents (ST23 (n=2), ST2642, ST92, ST224). Une analyse complémentaire par WGS et cgMLST des souches ST23 isolées en 2018 de 5 patients résidant dans le bassin de vie d'Annecy (dont 2 dans cet épisode) a été réalisée. Les 5 souches présentaient le même cgMLST. Une analyse phylogénétique basée sur les SNP a donc été conduite, elle a confirmé le caractère non relié des souches cliniques pour 3 d'entre elles. Pour les 2 autres génomes, aucun SNP n'a été observé ; les 2 cas résidaient à l'extérieur d'Annecy à environ 10 km l'un de l'autre (dont 1 était inclus dans l'épisode). La ré-analyse des questionnaires de ces 2 cas n'a pas permis d'identifier un lieu commun d'exposition.

Pour l'un des cas domicilié à Annecy le Vieux, une comparaison de la souche clinique (ST23) avec des souches ST23 issues de l'eau de la douche de son domicile par WGS, cgMLST et analyse phylogénétique basée sur les SNP a révélé des profils identiques, permettant d'identifier la source de contamination.

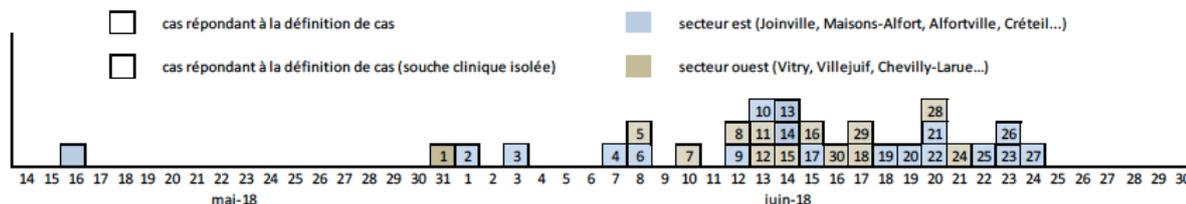
Au total, cette situation s'inscrit dans un contexte de forte recrudescence de cas de légionellose en mai-juin 2018 en région Auvergne-Rhône-Alpes. Il apparaît globalement que l'ensemble de ces cas n'ont pas de source de contamination commune.

- **Autres épisodes de cas groupés de légionellose sur la période mai-juin 2018**

Si la région Ile-de-France a montré une recrudescence particulière du nombre de cas, tous les départements franciliens n'étaient pas uniformément concernés (cf tableau ci-dessous, d'après C. Bassi, Cire IDF). En particulier, une recrudescence forte dans le département du **Val-de-Marne** (94) a été observée.

Département de résidence	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet
75	6	3	6	4	2	14	5
77	2	3	4	3	5	11	2
78	0	2	5	2	4	12	1
91	1	2	5	1	2	12	3
92	4	0	4	2	1	12	5
93	3	3	2	2	6	13	2
94	2	2	3	5	3	32	0
95	1	2	3	1	3	13	3

Parmi les 32 cas observés, 30 ont résidé ou se sont déplacés dans le secteur Nord-Ouest du département (communes de Vitry-sur-Seine, Alfortville, Maisons-Alfort ou commune limitrophe) dans les jours précédant leurs signes cliniques (cf courbe épidémique ci-dessous, d'après C. Bassi, Cire IDF).



Parmi les 30 cas, 12 souches cliniques ont été isolées et typées, montrant une forte hétérogénéité entre les souches puisque 8 profils de ST différents ont été identifiés. Un WGS avec analyse du cgMLST a été réalisé sur les 9 souches de ST identique : ST23 (n=3), ST47 (n=2), ST146 (n=2), ST62 (n=2) (Figure 38). Seules les 2 souches ST 62 présentaient des cgST identiques, suggérant une possible source commune de contamination pour seulement 2 cas.

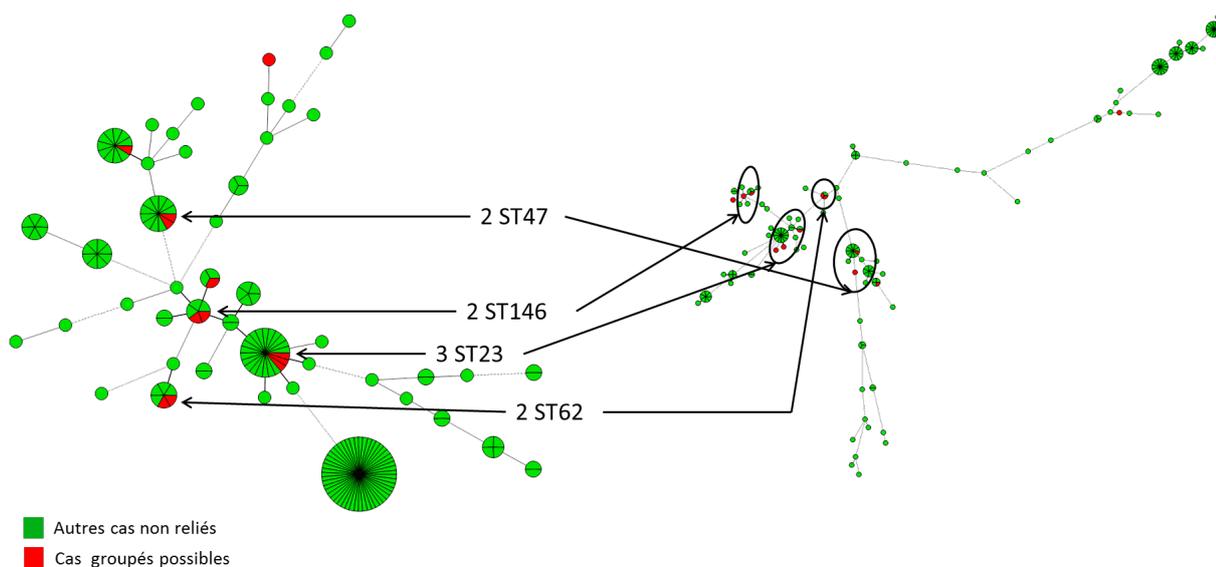


Figure 398. Minimum spanning tree SBT et cgMLST

Aucune source de contamination (réseaux d'ECS au domicile des cas, Tars du secteur, auto-laveuses, fontaines et brumisateurs investigués) n'a été identifiée comme source à l'origine d'un ou plusieurs cas.

Ces éléments sont à aussi en faveur de sources de contamination différentes pour les cas dans une période avec des conditions climatiques exceptionnelles particulièrement favorables à la survie des légionelles dans l'environnement. Le nombre de cas rapporté ensuite en juillet 2018 dans le secteur s'est avéré ensuite similaire à celui observé les années précédentes.

De façon similaire,

la comparaison des 5 souches isolées parmi les 12 cas observés dans le département des **Hauts-de-Seine (92) en juin 2018** a montré que ces souches étaient différentes (ST23 (n=2), ST146, ST82, ST1) ; l'analyse par WGS et cgMLST des 2 souches ST23 a permis de confirmer qu'elles n'étaient pas identiques ;

la comparaison de 4 souches isolées et d'un profil de nested-SBT (5 gènes/7) parmi les 10 cas observés dans la communauté d'agglomération de **Saint-Etienne (42) sur la période juin – juillet 2018** a montré que ces souches étaient différentes (ST109, ST44, ST94, ST701) ;

la comparaison des 2 souches isolées parmi les 5 cas observés dans les communes limitrophes de **Givors (69700) et Grigny (69720) en mai – juin 2018** a montré des souches de ST différents (ST23 et ST59).

- **Episode de cas groupés à Amiens**

L'analyse systématique par WGS des souches sur cette période a permis de mettre en évidence fortuitement un lien épidémiologique entre 2 patients ayant fréquenté le même hôpital mais pas le même service, pour lesquels un isolat clinique ST1 était disponible.

- **Surincidence de cas groupés sur l'île de La Réunion**

En février – mars 2018, le CNR a été alerté par une surincidence de cas de légionellose au sud de l'île de la Réunion. Les cas avaient été diagnostiqués par la positivité de l'antigène urinaire ou de la PCR.

Afin de procéder à l'investigation des cas, en concertation avec l'ARS et les équipes hospitalières (hygiénistes, biologistes médicaux) du GH Sud Réunion, le CNR a analysé les prélèvements suivants :

- 2 prélèvements respiratoires (crachats et écouvillonnage naso-pharyngé) réalisés chez 2 patients montrant une PCR *Legionella* spp positive; nous avons identifié une *L. gratiana* par PCR 23S-5S pour ces deux prélèvements, mais les souches n'ont pu être isolées ;
- 1 souche clinique de *L. pneumophila* isolée du prélèvement d'un 3^{ème} cas, présentant un ST jamais identifié dans la base de données française et européenne (ST 2692) ;

- 2 prélèvements de sérum réalisés à 3 semaines d'intervalle chez un 4ème cas, montrant un titre positif pour *L. bozemanii*, *L. dumoffi* et *L. gratiana* ;
- 15 souches environnementales isolées à différents points du réseau d'ECS du CHU de Saint-Pierre, dont 5 *L. pneumophila* sérogroupe 6 et 10 étaient des *L. pneumophila* sérogroupe 1, ST1, différentes des souches cliniques.

L'espèce *L. gratiana* étant rarement isolée dans un contexte d'infection, il est très probable que les deux premiers cas aient été exposés à une source commune. Néanmoins, malgré les investigations menées par l'ARS, cette source n'a pu être identifiée.

- **Investigation de cas groupés sur Dunkerque (59)**

Le CNR a été sollicité pour l'investigation de 13 cas de légionellose survenus sur la période de juillet – octobre 2018 dans la région de Dunkerque (59). Un prélèvement broncho-pulmonaire a été adressé au CNR pour 10 cas mais aucune souche clinique n'a pu être isolée, rendant toute comparaison impossible.

- **Cas groupés dans une fratrie ayant rendu visite à ses parents**

Au début du mois de juillet 2018, deux cas de légionellose ont été diagnostiqués à quelques jours d'intervalle chez un frère de 46 ans et sa sœur de 49 ans domiciliés respectivement en Savoie et dans la région de Tourcoing. L'interrogatoire des deux cas rapporte que fin juin, ils avaient rendu visite à leurs parents domiciliés en Dordogne. La comparaison de 2 souches de *L. pneumophila* sérogroupe 1 isolées d'un prélèvement d'ECS réalisé début juillet au niveau d'une douche située au sous-sol du domicile des parents des cas avec les 2 souches cliniques a montré un profil identique ST120, rarement isolée en France, en faveur d'une contamination du frère et de la sœur au domicile parental.

- **Cas groupés chez un couple de patients immunodéprimés**

En novembre puis décembre 2018, deux cas de légionellose ont été diagnostiqués par antigénurie positive à presque 2 mois d'intervalle chez un patient de 70 ans souffrant d'un cancer et sa compagne atteinte d'un cancer du pancréas, à l'issue d'une chimiothérapie. Une souche clinique a pu être isolée uniquement chez le premier cas, qui présente un ST16. Dans les suites du second cas, une enquête au domicile de sa compagne a été réalisée. Elle a révélé la présence de *L. pneumophila* sérogroupe 1 en quantité importante (25.000 UFC/L) sur un prélèvement d'ECS réalisé au niveau du robinet du lavabo de la cuisine, point d'eau avec lequel sa compagne s'était lavé les cheveux quelques jours avant le début de ses signes cliniques fin décembre 2018. La comparaison de la souche clinique isolée chez le cas n°1 avec les souches environnementales a montré un profil identique, ST16. En raison de la fréquence rare de ce ST en France (<1%), il est très probable que le cas n°1 se soit contaminé au domicile de sa compagne. En l'absence de souche clinique isolée pour le cas n°2, nous ne pouvons conclure formellement sur l'origine de contamination mais il est également très probable qu'elle se soit contaminée à partir du même point d'eau.

Cas groupés de 2019 :

- **Epidémie à Strasbourg (novembre – décembre 2019) lié à un chauffage collectif à biomasse.**

Cet épisode de 28 cas groupés de légionellose survenus dans la région de Strasbourg a identifié pour la première fois le risque d'une centrale de chauffage à biomasse d'un éco-quartier. Le CNR a réceptionné des échantillons pour 18 patients (prélèvements respiratoires ou ADN) dont les premiers symptômes sont apparus entre le 31 octobre et le 20 décembre 2019. Au total, nous avons pu conclure que 12 patients ont été infectés par une souche de profil ST 62, et pour 2 patients les résultats incomplets étaient compatibles avec un ST 62. Les génomes complets des 9 souches cliniques disponibles pour 9 patients partageaient le même ancêtre commun le plus récent, suggérant source de contamination commune. Après l'expertise de plusieurs sites suspectés (TARs d'Illkirch, Kim et Cristal Union (souches de profils non ST62) ou de la blanchisserie du CHU de Strasbourg (prélèvements négatifs)), des prélèvements environnementaux ont été réalisés au niveau des **eaux de la chaufferie à biomasse** du quartier des Tanneries où une forte concentration de Lp1 (10^5 - 10^6 UFC/L) a été identifiée. Les 8 souches Lp1 ST62 isolées de l'eau de condensat du bac de relevage partageaient avec les 9 souches d'origine clinique le même ancêtre commun le plus récent (0 à 2 SNPs de différence), confirmant cette source de contamination.

Au cours de cet épisode, des cas inclus avec ST62 ont été enregistrés jusqu'à 5,8 km de la source. Cette chaufferie à biomasse étant en fonctionnement depuis 2016, nous avons répertorié en collaboration avec l'ARS les cas avec souches ST62 disponibles envoyées au CNR par le département 67 entre 2016 et l'épisode de cas groupés de 2019 et nous les

avons analysées par WGS. Parmi les 4 cas avec souches ST62 identifiés, les résultats de WGS montrent que 2 ne sont pas liés à la souche environnementale de décembre 2019 (> 6000 SNPs). Les 2 autres appartiennent au même cluster et partagent le même ancêtre commun le plus récent que les souches d'origine clinique et environnementale de l'épisode de cas groupés de 2019 (1 SNP de différence). Ces 2 cas appartenaient à un cluster de 4 cas en janvier 2019 habitant ou séjournant dans la partie Ouest de Strasbourg, pour lesquels les investigations n'avaient pas permis d'identifier la source de contamination (Figure 39).

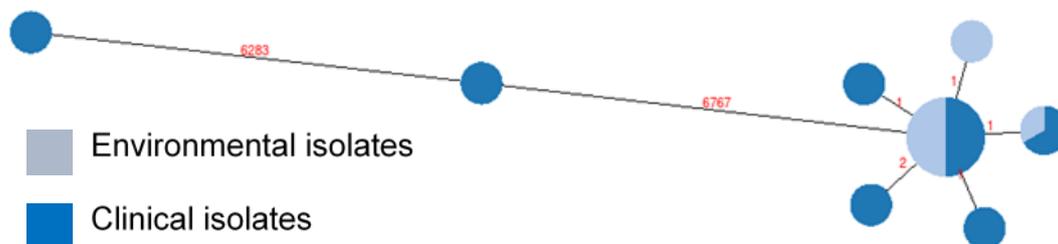


Figure 39. Minimum spanning tree of 21 *L. pneumophila* serogroup 1 ST62. Light blue charts represent environmental isolates from the collective biomass heating plant, dark blue charts represent the isolates from the patients, red numbers represent SNPs.

- **Cas groupés de fièvre de Pontiac et légionellose - Camping à Béziers.**

Au mois d'août 2019, le CNR a enquêté sur des cas groupés de fièvre de Pontiac et de légionellose dans le département de l'Hérault. Le 22/08, le CH de Béziers a signalé à l'ARS Occitanie 3 cas de légionellose confirmés par antigène urinaire pour 3 enfants d'une même famille hollandaise (famille A), séjournant en vacances dans un mobile home d'un camping de l'Hérault depuis le 17 août. Le père étant également symptomatique, des prélèvements respiratoires ont alors été envoyés au CNR pour les 5 membres de la famille. La mise en culture des prélèvements respiratoires était négative. Les PCR *Legionella pneumophila* sérotype 1 réalisées sur ces prélèvements ont été positives pour les 4 patients symptomatiques et négative pour la mère. Un typage moléculaire réalisé directement sur les prélèvements par Nested-Sequence-Based Typing (N-SBT) a permis d'obtenir une amplification pour 5 gènes sur 7, uniquement pour l'un des 4 patients, montrant un profil compatible avec un ST 96. En parallèle, a été notifié à l'ARS un cas de légionellose chez un sujet ayant fréquenté le même camping entre le 4 et le 18 août. Le CNR a reçu un prélèvement de crachats qui s'est avéré négatif en culture et PCR. Aucun typage complémentaire et donc aucune comparaison n'a pu être réalisée.

Par ailleurs, les autorités sanitaires des Pays-Bas ont signalé à Santé publique France 4 cas de fièvre de Pontiac parmi les membres d'une autre famille hollandaise (famille B) (antigènes solubles urinaires positifs, sans notion de pneumopathie associée), de retour d'un séjour au camping dans un mobile home avec jacuzzi privatif entre le 3 et le 21 août. Ils connaissaient la première famille hollandaise (famille A) et les deux familles se sont baignées dans le même jacuzzi.

Dans le cadre de la surveillance des cas liés aux voyages, des notifications au réseau ELDSNet ont été réalisées le 22 et le 23 août par Santé publique France pour les 5 cas diagnostiqués en France correspondant ainsi à une situation de « rapid evolving cluster » tel que défini par le réseau ELDSNet. Les médecins de secteur ont été sensibilisés par l'ARS Occitanie à la présence d'une suspicion de cas groupés de légionellose et à l'éventualité de l'apparition de cas, notamment pédiatriques, ce qui est assez rare.

Dans le cadre de l'enquête environnementale, 3 souches de *L. pneumophila* sérotype 1 provenant de différents jacuzzis rattachés à des mobile homes individuels ont été analysés par le CNR. Elles présentaient un *Sequence Type* (ST) : 96. Ce profil comporte 5 gènes identiques à celui de la souche responsable de l'infection chez un des cas cliniques, ce qui nous a amené à conclure que cette source de contamination était vraisemblable. Le CNR a également reçu et analysé une souche de *L. pneumophila* sérotype 1 du CNR des *Legionella* de Hollande provenant d'un jacuzzi dont un échantillon d'eau avait été conservé par la famille A. Le typage épidémiologique de cette souche a été réalisé par *Sequence-Based Typing* (SBT). Elle présentait aussi un *Sequence Type* (ST) : 96.

- **Suspicion de cas groupé de légionelloses sur la commune de Rochefort ; juin 2019.**

Plusieurs cas de légionelloses ont été signalés ayant un lien avec la ville de Rochefort (passage aux thermes ou domicile) en juin 2019. En tout, 4 cas, dont 3 ayant fréquenté les thermes et le 4^{ème} domicilié à Rochefort ont été notifiés. Un seul

prélèvement pulmonaire a été reçu au CNR, et a permis d'isoler des Lp1 ST47. Concernant l'enquête environnementale, les autocontrôles de l'établissement thermal ont été étudiés et tous étaient conformes. Plusieurs autres sites ont été ciblés notamment la lagune du conservatoire littoral et du bassin pluvial (négatifs en PCR), l'eau du brumisateur sortie aspergeur, le centre horticole municipal (PCR Lp1 positive, mais aucun Nested-Sequence-Type n'a pu être obtenu). Au total, ni le caractère groupé sur le plan microbiologique, ni la source de contamination n'ont pu être confirmés pour cet épisode.

Cas groupés de 2020 :

- **Episode de cas groupés de légionelloses liés à un séjour à Brides-les-Bains, Savoie, septembre-octobre 2020.**

Entre le 1er septembre et le 2 novembre 2020, 8 cas de légionellose ayant fréquenté Brides-les-Bains (Savoie) pendant leur période d'exposition (10 jours précédant la date de début de leurs symptômes) ont été identifiés par l'ARS. Il s'agit de 5 hommes et 3 femmes, d'âge médian 70 ans (min : 66 ans, max : 77 ans). Les 8 cas ont été diagnostiqués par antigène urinaire positif. Tous ont été hospitalisés et tous ont eu une évolution favorable.

Les patients étaient domiciliés dans différentes régions, aucun n'était domicilié à Brides-les-Bains mais tous avaient fréquenté les thermes. Dès les premiers cas, des investigations ont été menées auprès des thermes. L'établissement thermal était fermé depuis le 30 octobre 2020 date du début du 2ème confinement.

Pour 4 cas, un prélèvement respiratoire bas a été réalisé mais l'ensemble des résultats étaient négatif en culture et PCR. Aucune souche clinique n'était donc disponible pour ce cas groupé.

Les analyses environnementales ont concerné de nombreuses sources potentielles : les lieux d'hébergement des patients, des points d'eau publique de Brides-les-Bains (fontaine, WC public, etc), les points d'eau de l'établissement thermal de Brides-les-Bains et de l'établissement thermal de Salins-les-thermes. La présence de *Legionella pneumophila* a été identifiée dans une résidence et dans les 2 établissements thermal.

L'absence de souche clinique exclue toute comparaison avec les souches environnementales disponibles. Cependant, compte-tenu de la récurrence des situations de cas de légionellose en lien avec la fréquentation de Brides-les-Bains, il a été décidé de transmettre les souches environnementales disponibles au CNR pour conservation et comparaison future si une nouvelle situation se présente.

- **Trois cas de légionellose à *L. longbeachae* en Vendée entre avril et aout 2020.**

Trois cas de légionellose (*L. longbeachae*) ont été signalés en 4 mois en Vendée (2 cas domiciliés sur la côte littorale et 1 cas dans les terres à environ 80 km). Le diagnostic a été posé par PCR par le CNR-L. Pour 2 cas, nous avons isolé une souche *L. longbeachae* par culture. Il s'agissait de 3 hommes âgés de 54 à 74 ans. Un des 3 cas est décédé. La notion de jardinage a été retrouvée pour les 3 cas mais pas la manipulation de terreaux ou composts qui n'a été notifiée que pour 1 des 3 cas. Pour ce dernier cas, une analyse par PCR et culture de 2 terreaux utilisés a été réalisée au CNR-L. Celle-ci n'a pas permis de confirmer la présence de *Legionella longbeachae* dans le terreau suspecté mais les analyses par biologie moléculaire montrent la présence de plusieurs espèces de *Legionella* au sein de ces échantillons.

- **Suspicion de séries de cas nosocomiaux à l'Hôpital d'Instruction des Armées de Toulon**

Suite à la survenue de 2 cas de légionellose suspecté nosocomiale en 2019 et 2020 à l'Hôpital d'Instruction des Armées (HIA) de Toulon, ce dernier a sollicité l'expertise du CNR pour comparer l'ensemble des souches cliniques et environnementales analysées et conservées au CNR afin de déterminer une éventuelle source de contamination commune.

Pour les 2 cas investigués en 2019 et 2020, les infections étaient dues à des *Legionella pneumophila* séro groupe 1 ST (Sequence Type) 1 mais la souche n'a pu être isolée que pour le cas de 2020 ; le typage épidémiologique du cas de 2019 ayant été réalisé par Nested-SBT. En parallèle, 8 souches environnementales isolées du service d'oncologie de l'HIA en 2019 et 10 souches environnementales isolées du service de chirurgie de l'HIA en 2020 ont été reçues au CNR et ce sont avérées êtres des *Legionella pneumophila* séro groupe 1 ST 1. Le ST1 étant endémique, ceci n'était pas suffisant pour conclure quant à la source de contamination.

Le CNR a donc repris les analyses de génomes complets de toutes les souches ST1 isolées en lien avec l'HIA et les a comparées entre elles ainsi qu'avec d'autres souches de ST1 non reliées à l'HIA. Toutes les souches environnementales de l'HIA qu'elles proviennent du service d'oncologie ou de chirurgie et la souche du cas de 2020 étaient identiques, présentant le même core genome MLST et le même ancêtre commun le plus récent, et étaient par ailleurs différentes d'autres ST1 isolées en France, ce qui conforte l'hypothèse d'une contamination nosocomiale pour ce patient et d'une colonisation du réseau de l'HIA avec la même souche depuis 2019.

Cas groupés de 2021 :

- **7 cas aux alentours de Clermont-Ferrand en février 2021**

Nous avons reçu et analysés des souches et/ou prélèvements pour 5 de ces cas. 2 souches ont pu être isolées en culture présentant un Sequence Type 259 et un typage directement sur prélèvement par nested-SBT a permis d'identifier que la souche responsable de l'infection chez un 3^{ème} patient était probablement également de ST 259. Il est donc possible qu'une source commune soit à l'origine de l'infection de ces 3 cas mais celle-ci n'a pas pu être identifiée.

- **12 cas aux alentours de Clermont Ferrand de juillet à octobre 2021, dont plusieurs cas grave ayant nécessité une hospitalisation en réanimation**

2 souches de *Legionella* ont pu être isolées en cultures et 2 prélèvements ont pu être analysés par Nested-SBT. Pour ces 4 cas, les souches responsables de l'infection étaient de ST différents, en faveur d'une surincidence saisonnière sans lien avec une source de contamination commune.

- **4 cas à La Rochelle**

2 souches de *Legionella* ont pu être isolées en cultures et 1 prélèvement a pu être analysé par Nested-SBT. Pour ces 3 cas, les souches responsables de l'infection étaient de ST différents, en faveur d'une surincidence saisonnière sans lien avec une source de contamination commune.

- **6 cas répartis de 2016 à 2021 en lien avec une résidence à Palavas les Flots**

Une seule souche de *Legionelle pneumophila* séro groupe 1 ST23 a pu être isolée pour un patient en 2017. Plusieurs souches environnementales ont été reçues en 2016, 2017 et 2019. Celles-ci présentaient également un ST23. Le ST23 étant endémique, une analyse phylogénétique a été réalisée et montre que les souches environnementales des 3 années, ainsi que la souche clinique isolée en 2017 sont reliées entre elle. Les logements de la résidence de palavas semblent être la source de contamination.

- **7 cas en lien avec les Thermes de Saujon**

Les thermes de Saujon ont été l'objet d'une enquête à 2 reprises en 2019 et 2021 suite à 4 cas dont un décès entre juillet et octobre 2019 puis de nouveau 3 cas de septembre à novembre 2021. Seule une souche clinique de 2019 était disponible, il s'agissait d'une *Legionella pneumophila* séro groupe 1, Sequence Type 42. L'enquête environnementale a retrouvé la présence de *Legionella pneumophila* dans différents prélèvements d'eau réalisé en décembre 2021 aux thermes de Saujon. Plusieurs souches ont été typées et bien qu'une diversité au sein du réseau ait été observées, certaines d'entre elles présentaient le profil *Legionella pneumophila* ST 42, identique à souche de la patiente de 2019. En avril 2022, un nouveau cas a été déclaré en lien avec ces thermes. Bien que l'enquête environnementale de 2022 n'ait pas montré cette fois ci, la présence de *Legionella pneumophila* dans le réseau d'eau des therems, la souche clinique isolée du prélèvement respiratoire de la patiente présente de nouveau un profil *Legionella pneumophila* ST 42.

- **Sur-incidence de cas autour de Strasbourg en juillet-août 2021**

Du 1^{er} juin au 1^{er} septembre 2021, 40 cas de légionellose résidant dans le département du Bas-Rhin ont été déclarés à l'Agence régionale de Santé. Parmi ces cas, 26 ont fréquenté une des communes de l'agglomération de Strasbourg (Eurométropole) durant leur période d'exposition. Les cas étaient majoritairement des hommes (7 femmes pour 19 hommes), d'âge médian 58 ans (min : 21 ans, max : 87 ans). Deux décès ont été enregistrés. Un prélèvement bronchique a été réalisé pour 13 cas et une souche a été isolée pour 10 cas. Pour 3 cas une nested PCR a été réalisé directement sur le prélèvement. Il s'agissait d'une *Legionella pneumophila* de séro groupe 1 pour 12 des 13 cas, 1 souche de séro groupe Lp 2-14 a été identifiée pour 1 cas. Le CNR a réalisé des analyses permettant de déterminer le Sequence Type (ST). Les ST identifiés n'étaient pas tous identiques : 6 souches présentaient un ST 224 ou compatible avec un ST 224 et 6 souches un autres ST ou un autre séro groupe (2 ST 23, 1 ST 624, 1 ST82 ; 1 cas de ST non déterminé mais non compatible avec le 224). Enfin un cas était de séro groupe Lp 2-14. Le ST 224 est un ST fréquent notamment dans la région et sa proportion par rapport aux autres années n'était pas augmentée en 2021. Ainsi, la discussion collective conduit à conclure l'origine de l'épisode à mettre en lien avec des conditions climatiques favorables au développement et à la survie des bactéries dans l'air et à la probable présence de sources communautaires multiples non identifiées. Ce phénomène d'augmentation forte de légionellose a d'ailleurs été observé sur toute la France.

- **5 cas de légionellose à *L. longbeachae* en vendée**

Cinq cas de légionellose à *Legionella Longbeachae*, dont deux décès, ont été déclarés entre le 15/05/2020 et le 29/07/2021. Il s'agissait de 5 hommes, âgés de 54 à 82 ans, domiciliés dans différentes communes de Vendée. Aucun cas n'a été observé sur la période automne/hiver (septembre 2020 à juin 2021). Le diagnostic a été posé par PCR (prélèvement adressés au CNR-L par le CHD de Vendée). Tous les cas ont manipulé du terreau, du compost et/ou du fumier durant leur période d'exposition ou ils possédaient ce type de produits à domicile. Cependant aucun produit commun aux cas n'a été identifié et aucune autre source d'exposition évidente n'a pas été retrouvée par ailleurs. Pour 4 de ces patients, des analyses des terreaux ont été réalisées au CNR (cf. résultats en 3.2.4.3)

- **17 cas autour de Rochefort avec une TAR suspectée**

Plusieurs cas de légionelloses ont été signalés ayant un lien avec la ville de Rochefort (passage aux thermes ou domicile) comprenant 3 cas en 2019, 8 cas en 2019, 5 cas en 2020 et 1 cas en 2021. Un seul prélèvement pulmonaire a été reçu au CNR, et a permis d'isoler des Lp1 ST47. Concernant l'enquête environnementale, les autocontrôles de l'établissement thermal ont été étudiés et tous étaient conformes. Plusieurs autres sites ont été ciblés notamment la lagune du conservatoire littoral et du bassin pluvial, l'eau du brumisateur sortie aspergeur et le centre horticole municipal, tous négatif. En décembre 2021 lors d'un contrôle inopiné sur une TAR, 1 300 000 UFC/L de *L. pneumophila* séro groupe 1 a été signalé. Cinq de ces souches ont été typées au CNR et présentent un ST1, donc différent de la seule souche de patient isolée depuis le début de ces cas. A ce jour, ni le caractère groupé sur le plan microbiologique, ni la source de contamination n'a pu être confirmés pour cet épisode.

- **5 cas de légionelloses suspectées nosocomiales en lien avec le CH de Villefranche**

Suite à la déclaration de plusieurs cas de légionellose suspectées nosocomiales au CH de Villefranche, nous avons reçu des prélèvements respiratoires pour 5 patients. Un seul s'est avéré positif en culture avec des souches de *Legionella pneumophila* séro groupe 1, typées au séquençage du génome complet et présentant un Sequence Type ST1. Pour les autres patients, la culture des prélèvements respiratoires étaient négatives mais pour 2 d'entre eux, la technique de typage directement sur prélèvement a permis d'identifier des souches de Lp1 ST1 ou compatible ST1. 10 souches environnementales Lp1 isolées de différents points d'eau au CH de Villefranche ont été analysées. Celles-ci présentaient également un ST1. Le ST1 étant endémique, cette seule information ne permettait pas de conclure l'enquête épidémiologique. Une analyse de génome complet a été réalisée sur la souche clinique et les 10 souches environnementales montrant un lien phylogénétique entre elles et étant donc en faveur d'une contamination au CH de Villefranche pour ce patient. Pour les autres patients, les données de typage directement sur prélèvement ne permettent pas de réaliser une analyse phylogénétique.

**Lettre d'agrément pour le transfert de matériel
du Centre National de Référence des Légionelles**
(A faire en double exemplaire)

En réponse de la requête émise par :
désigné Demandeur
du matériel :

au Centre National de Référence des Légionelles désigné CNRL.

Le CNRL demande que le Demandeur accepte que :

- Le Matériel fournis par le CNRL reste la propriété du CNRL et qu'il est mis à la disposition du Demandeur pour ses activités.
- Le Matériel est utilisable pour l'enseignement et la recherche à but non lucrative.
- Le Matériel ne pourra pas être redistribué par le Demandeur à un tiers autre que les collaborateurs impliqués dans la réalisation du programme de travail et travaillant directement sous l'autorité du responsable du laboratoire destinataire. Toute demande sera automatiquement signalée au CNRL et le transfert ne pourra se faire qu'après signature d'une Lettre d'agrément pour transfert de matériel avec le nouveau Demandeur et le CNRL.
- Les deux parties s'engagent à garder confidentielles toutes les informations transmises oralement, par écrit ou de toute autre manière, dans le cadre du présent Accord et se rapportant au MATERIEL. Ces INFORMATIONS ne pourront pas être communiquées à des tiers sans autorisation préalable et écrite.
- Le Demandeur informera le CNRL, de manière régulière et confidentielle, des résultats de ses travaux obtenus avec ou à partir du MATERIEL.
- Conformément aux usages scientifiques en vigueur, toutes les publications ou communications ayant trait à l'utilisation du MATERIEL font référence à l'origine CNRL. De même, la contribution des agents CNRL ayant rendu le MATERIEL accessible sera mentionnée expressément dans toutes les publications ou communications, soit par remerciements, soit en qualité de co-auteurs.
- Le CNRL est reconnu comme le propriétaire exclusif du MATERIEL et des droits de propriété intellectuelle afférents.
- Il est expressément convenu entre les Parties que le droit d'utilisation du MATERIEL concédé au titre du présent Accord ne peut, en aucun cas, être interprété comme conférant, de manière expresse ou implicite, à un quelconque droit ou titre de propriété, ou option ou licence sur le MATERIEL fourni par le CNRL.
- Au cas où les résultats obtenus seraient susceptibles de conduire au dépôt d'une demande de titre de propriété industrielle, les Parties décideront d'un commun accord de la stratégie à mettre en œuvre en matière de protection et d'exploitation de ces résultats et, le cas échéant, des personnes habilitées à procéder à un tel dépôt et/ou à une telle exploitation.
- Le Demandeur reconnaît que Matériel est de nature expérimentale et que le CNRL ne donne aucune garantie, quant à son état, son activité, son utilité, son efficacité, sa pureté, son innocuité, sa non-toxicité, sa sécurité, quant à son utilisation, sa valeur commerciale ou sa conformité à un quelconque but.
- Le demandeur est seul responsable de tout risque ou dommage pouvant découler de l'exécution du présent Accord, notamment en cas de blessure, mort, dommage matériel ou tout autre sinistre ou préjudice pouvant résulter de l'usage, des essais ou de la manipulation du MATERIEL.
- Le Demandeur s'engage à utiliser le Matériel selon les lois et réglementations en cours.
- Le Matériel est fournis gratuitement.

Le Demandeur et le CNRL, par le biais de personnes autorisées, doivent signer chacune les deux copies, une copie signée étant gardé par le Demandeur et l'autre par le CNRL.

Le Centre National de Référence des Légionelles
Nom de la personne autorisée :
En qualité de :
Organisation : Centre National de Référence des Légionelles,

Institut des Agents Infectieux, Hôpital de la Croix Rousse
103 Grande rue de la Croix Rousse
69004 Lyon
Signature

Le Demandeur
Nom de la personne :
Organisation :
Adresse :

Signature

Date