

## Notes techniques

# TRAITEMENT DES RÉSEAUX D'EAU: LES AMIBES PEUVENT CACHER DES LÉGIONELLES

Les légionelles ont trouvé leur cheval de Troie: les amibes, dans lesquelles elles se multiplient et sont protégées des traitements réalisés dans les réseaux d'eau. Le contrôle de la prolifération des légionelles doit donc se faire de façon coordonnée avec le contrôle de la croissance des amibes.

CHRISTINE  
DAVID  
INRS,  
département  
Expertise  
et conseil  
technique

C'est une réalité: malgré de régulières opérations de nettoyage, il n'est pas rare de voir réapparaître dans les réseaux d'eau industriels et sanitaires la bactérie *Legionella pneumophila* ou légionelle. Vivant naturellement dans l'eau, celle-ci représente un problème en santé publique mais également en santé au travail. En effet, l'inhalation d'aérosols d'eau contaminée par ce micro-organisme peut entraîner des fièvres de Pontiac (état grippal), mais aussi des légionelloses chez les personnes fragilisées (en cas d'immunodépression, de diabète, d'alcoolisme, de tabagisme...). Cette maladie grave est due à la pénétration des légionelles ( $\approx 5 \mu\text{m}$ ) dans les macrophages<sup>1</sup> ( $\approx 50 \mu\text{m}$ ) des alvéoles pulmonaires, où elles se répliquent avant de sortir en détruisant les cellules, provoquant ainsi les symptômes de la légionellose.

### Un biofilm protecteur

Comment expliquer la réapparition des légionelles? Cela est dû à différents mécanismes biologiques qu'il est important de connaître afin de mieux maîtriser la prolifération de ces bactéries. Rappelons tout d'abord que la surface interne des réservoirs et des canalisations d'eau (surtout les bras morts) est recouverte d'un biofilm dont l'aspect gélatineux est dû à une matrice composée de molécules secrétées par des micro-organismes qui interagissent entre eux: bactéries, champignons, protozoaires (amibes, ciliés?) et autres microalgues. Cette matrice, qui représente près de 85% du volume du biofilm, sert de véritable rempart à toute agression extérieure.

Le biofilm facilite les échanges entre cellules et n'est pas sans influence sur la prolifération des légionelles [1]. Celle-ci est ainsi inhibée par les bactéries *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas*

### RÉSUMÉ

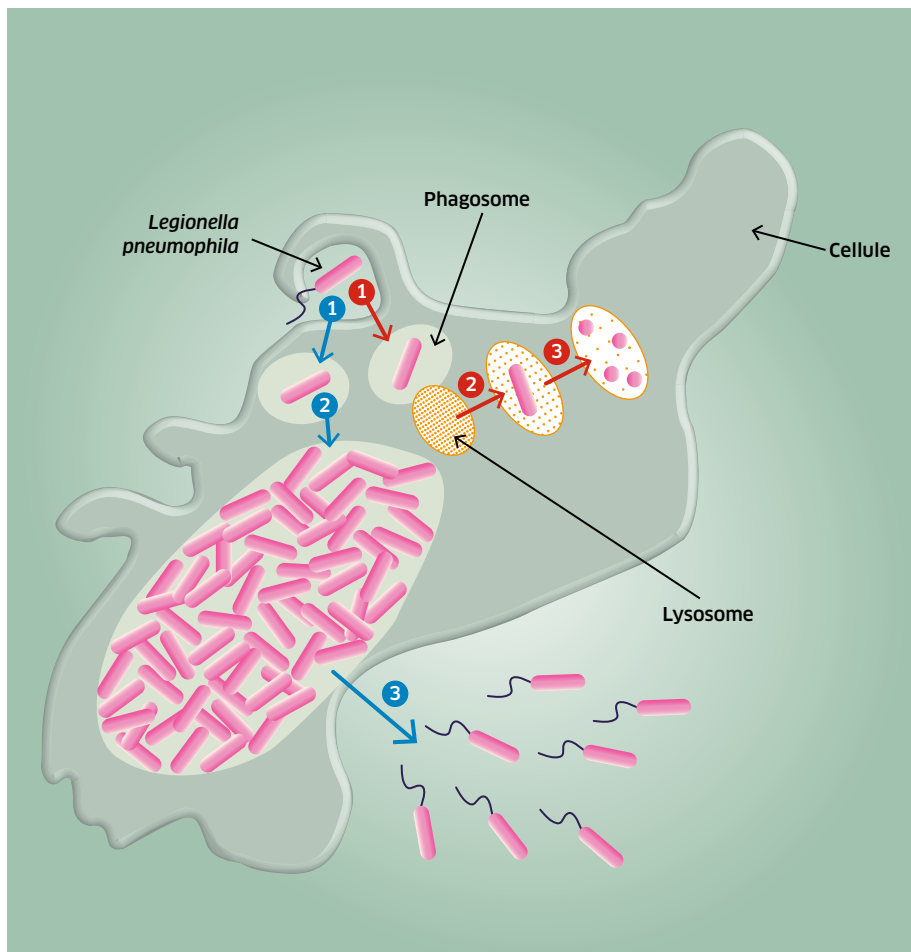
Des pics de légionelles peuvent apparaître après traitement des réseaux d'eau. Cela s'explique notamment par le fait que ces bactéries trouvent refuge dans des cellules plus grosses que sont les amibes. Ces dernières sont résistantes aux traitements bactéricides et relarguent les bactéries qui recolonisent les réseaux lorsque les conditions redeviennent favorables. Il est important de tenir compte de la concentration des amibes dans l'eau, pour gérer convenablement la contamination des réseaux.

### *Treating water networks: amoeba can conceal legionella*

*Legionella peaks can appear after water networks have been treated. This can be explained, in particular, by the fact that those bacteria find refuge in the larger cells constituted by amoeba. Amoeba are resistant to bactericidal treatments and they then release the bacteria that re-colonise the networks once the conditions become favourable to them again. It is important to take into account the concentration of the amoeba in the water, in order to manage the contamination of the networks appropriately.*

*aeruginosa* [2], ou alors favorisée par les algues comme *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Gleocystis* et les bactéries *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* ou *Fischerella* [3]. Les légionelles utilisent notamment les produits sécrétés par des cyanobactéries comme source de carbone et d'énergie [4]. Les amibes présentes dans ce biofilm mais aussi libres dans l'eau, favorisent tout particulièrement





→ **Scénario 1**  
Cycle de dégradation  
de la bactérie par phagocytose:

- 1 Pénétration de la légionelle et formation du phagosome.
- 2 Fusion du phagosome avec un lysosome.
- 3 Dégradation de la légionelle grâce au milieu acide et à des enzymes.

→ **Scénario 2**  
Cycle de résistance de la bactérie :

- 1 Pénétration de la légionelle et formation du phagosome.
- 2 Détournement du mécanisme cellulaire et multiplication de la bactérie.
- 3 Sortie des bactéries et mort cellulaire.

↑ **FIGURE 1**  
Cycles de vie  
de *L. pneumophila*  
dans les cellules  
(amibes,  
macrophages  
humains...).

la survie des légionelles. Les amibes sont des êtres unicellulaires ( $\approx 100 \mu\text{m}$ ), vivant majoritairement en flottant librement dans les eaux douces ou marines. La forme mobile (trophozoïte) se nourrit de bactéries, de levures et d'algues par phagocytose<sup>3</sup>. Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, les amibes s'immobilisent et prennent une forme de résistance: le kyste. Celui-ci se transforme à nouveau en trophozoïte lorsque les conditions redeviennent favorables. Or, certaines bactéries sont capables de survivre à la phagocytose et de se maintenir à l'intérieur d'une amibe enkystée comme les bactéries pathogènes *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycobacterium avium*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritica* Typhimurium et plusieurs espèces de *Legionella* [5].

Des légionelles ont ainsi été retrouvées dans des protozoaires ciliés comme *Tetrahymena* et de nombreuses espèces d'amibes libres: *Echinamoeba*, *Vahlkampfia*, *Saccamoeba*, *Vexillifera*, *Platyamoeba*, *Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Naegleria* [6]. Ces trois dernières sont les plus souvent isolées dans les canalisations d'eau [7].

Concrètement, l'amibe englobe une ou deux légionelles (Cf. Figure 1), puis au bout de 36 à 48 heures, les bactéries se sont multipliées et les vésicules

de phagocytose contiennent jusqu'à  $10^4$  bactéries [8]. Les légionelles sont ensuite relâchées dans le milieu extérieur au bout de 72 heures, en provoquant la lyse cellulaire. Les amibes contaminées par les légionelles peuvent également relarguer des vésicules contenant les bactéries [9].

**Plus résistants et plus virulents**

L'amibe sert donc de cheval de Troie en abritant la bactérie qui la parasite. Ce mécanisme biologique est d'autant plus problématique que les trophozoïtes, les vésicules relarguées et les kystes sont résistants aux biocides. Les kystes peuvent également résister aux hautes températures et au dessèchement [7]. Les légionelles qui s'abritent à l'intérieur bénéficient de cette résistance. Des études ont montré qu'un mois après le traitement d'un réseau d'eau sanitaire (choc thermique, chloration continue de 1,5 à 2 ppm de chlore), 30% des points d'eau étaient encore contaminés par des amibes [10].

Une fois relarguées de l'amibe, les légionelles acquièrent en outre une plus grande résistance aux conditions environnementales défavorables et aux biocides (dérivés d'isothiazolone, biguanide et ammonium quaternaire) que les bactéries issues de milieux de cultures [11]. De plus, les légionelles

s'étant multipliées à l'intérieur des amibes sont plus virulentes vis-à-vis des cellules de mammifère [12]. Enfin, l'inhalation d'amibes ou de vésicules contenant des légionelles semble plus pathogène qu'une quantité égale de bactéries inoculées seules ou qu'un *co-inoculum* de *L. pneumophila* et d'amibe non infectée par la bactérie [13].

### Priorité au traitement préventif

L'existence de ces phénomènes biologiques impose de maîtriser la concentration des amibes tout autant que celle des légionelles. La stratégie à adopter est prioritairement préventive. Elle consiste à rendre l'environnement défavorable au développement des micro-organismes, en employant par exemple des matériaux tels que le cuivre ou l'inox 316L, en limitant les bras morts du réseau, en bouclant le réseau (circulation permanente de l'eau et maintien de la température). On peut aussi purger régulièrement les bras morts (points de prélèvements, douches...), lutter contre le tartre et la corrosion (source de nourriture pour les micro-organismes) et procéder à des chocs thermiques quotidiens [14]. Les traitements curatifs ne sont pas des procédés de gestion de contamination d'un réseau d'eau, mais uniquement des moyens pour retrouver un niveau de fonctionnement acceptable. Les traitements peuvent être physiques (filtration 0,2 µm au

point d'usage dans les établissements de santé), chimiques (1 mg/l de chlore libre en continu ou 50 mg/l de chlore libre pendant 12 heures en traitement curatif...) ou thermiques (chauffage à 50/60°C en continu dans le réseau d'eau chaude sanitaire...) [14]. Toutefois, les kystes d'amibes résistent jusqu'à une température de 70°C et l'efficacité du chlore sur ces formes cellulaires reste limitée.

Aucun traitement n'est capable d'éliminer complètement le biofilm. Une association de plusieurs traitements permet de diminuer de façon plus ou moins importante le nombre de micro-organismes, mais leur interruption conduit irrémédiablement à une recolonisation du milieu. Les biocides sous-dosés tuant essentiellement les bactéries peuvent même stimuler la croissance des amibes se nourrissant des bactéries mortes. Il est important de maîtriser les traitements afin de ne pas stimuler les amibes et les bactéries pathogènes associées. ●

1. *Macrophage*: cellule qui joue un rôle important dans l'immunité grâce, notamment, à son pouvoir de phagocytose (destruction d'éléments étrangers).

2. *Cilié*: être vivant unicellulaire possédant des cils à sa surface.

3. *Phagocytose*: une cellule englobe des particules, qui peuvent être des bactéries, en les enveloppant dans une vésicule appelée phagosome. Les particules sont dégradées après fusion du phagosome avec une autre vésicule contenant un milieu acide et des enzymes.

## BIBLIOGRAPHIE

[1] ABDEL-NOUR M. ET AL. - *Biofilms: the stronghold of Legionella pneumophila*. Int. J. Mol. Sci. 14:21660-21675, 2013.

[2] MESSI P. ET AL. - *Survival of Legionella pneumophila in artificial aquatic microhabitats: macromethod*. VIII National Conference of public Health. Rome, Italy. 1: 220, 2003.

[3] BORELLA P. ET AL. - *Water ecology of Legionella and protozoan: environmental and public health perspectives*. 11: 355-380, 2005.

[4] TISON ET AL. - *Growth of Legionella pneumophila in association with blue-green algae (cyanobacteria)*. Appl. Environ. Microbiol. 39:456-459, 1980.

[5] GREUB G. ET AL. - *Micro-organisms resistant to free-living amoebae*. Clin. Microbiol. Rev. 17:413-433, 2002.

[6] FIELDS B. S. - *The molecular ecology of Legionellae*. Trends Microbiol. 4:286-290, 1996.

[7] STEINERT M. ET AL. - *Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray*. FEMS Microbiol. Rev. 26:149-162, 2002.

[8] KAGAN J. C., ROY C. R. - *Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites*. Nature Cell Biol. 4:945-954, 2002.

[9] BERK S. G. ET AL. - *Production of respirable vesicles containing live Legionella pneumophila cells by two Acanthamoeba spp.* Appl. Environ. Microbiol. 64:279-286, 1998.

[10] BREIMAN R. F. ET AL. - *Association of shower use with legionnaire's disease. Possible role of amoebae*. JAMA. 263:2924-2926, 1990.

[11] BARKER ET AL. - *Relationship between Legionella pneumophila and Acanthamoeba polyphaga: physiological status and susceptibility to chemical inactivation*. Applied and Environmental Microbiology. 58:2420-2425, 1992.

[12] CIRILLO J. D. ET AL. - *Intracellular growth in Acanthamoeba castellanii affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of Legionella pneumophila*. Infection and immunity. 67:4427-4434, 1999.

[13] BRIELAND J. K. ET AL. - *The role of Legionella pneumophila-infected Hartmannella vermiformis as an infectious particle in a murine model of legionnaire's disease*. Infect. Immun. 65:5330-5333, 1997.

[14] CSTB - *Maîtrise du risque de développement des légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire*. Ed. CSTB, 2012.