



HAL
open science

Étude du polymorphisme de séquence nucléique des gènes impliqués dans la réponse stringente chez *Legionella pneumophila*

Marion Levast

► **To cite this version:**

Marion Levast. Étude du polymorphisme de séquence nucléique des gènes impliqués dans la réponse stringente chez *Legionella pneumophila*. Sciences pharmaceutiques. 2006. dumas-01214133

HAL Id: dumas-01214133

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01214133v1>

Submitted on 9 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

1^{er} exemplaire



UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2006

N° 7001

**Etude du polymorphisme de séquence nucléique
des gènes de la réponse stringente
chez *Legionella pneumophila***

**MÉMOIRE
PRÉSENTÉ POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

DIPLÔME D'ÉTAT

Marion LEVAST

Née le 28 mars 1978 à La Tronche (Isère)

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE*

Le 5 janvier 2006

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury : Madame le Professeur R. Grillot

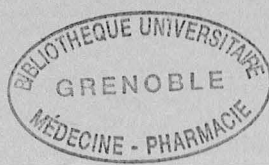
Membres : Monsieur le Professeur M. Maurin

Monsieur le Professeur J. M. Seigneurin

Monsieur le Professeur D. Schneider

Monsieur le Professeur J. Etienne

*La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.



**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année 2006

N°

**Etude du polymorphisme de séquence nucléique
des gènes de la réponse stringente
chez *Legionella pneumophila***

**MÉMOIRE
PRÉSENTÉ POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

DIPLÔME D'ÉTAT

Marion LEVAST

Née le 28 mars 1978 à La Tronche (Isère)

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE*

Le 5 janvier 2006

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury : Madame le Professeur R. Grillot

Membres : Monsieur le Professeur M. Maurin

Monsieur le Professeur J. M. Seigneurin

Monsieur le Professeur D. Schneider

Monsieur le Professeur J. Etienne

**La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : M. le Professeur **P. DEMENGE**
Vice-Doyenne : Mme **A. VILLET**

PROFESSEURS DE PHARMACIE

BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BURMEISTER	Wilhelm	Biophysique
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-Technique
DANEL	Vincent	Toxicologie
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Bio-Inorganique
DEMENGE	Pierre	Physiologie / Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie / Biotechnologie
FAVIER	Alain	Biochimie / Biotechnologie
GOULON	Chantal	Biophysique
GRILLOT	Renée	Parasitologie
LECLERC	Gérard	Chimie Organique
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique
RIBUOT	Christophe	Physiologie / Pharmacologie
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEW	Denis	Pharmacie Galénique

PROFESSEUR ASSOCIE (PAST)

CHAMPON	Bernard	Pharmacie Clinique
----------------	---------	--------------------

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie
ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique
BARTOLI	Marie-Hélène	Pharmacie Clinique et Biotechn.
BOUMENDJEL	Ahcène	Pharmacognosie
BRETON	Jean	Parasitologie
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie et génie de la formulation
DELETRAZ	Martine	Droit Pharmaceutique Economie
DEMEILLERS	Christine	Biochimie
DESIRE	Jérôme	Chimie Bioorganique
DIJOUX-FRANCA	Marie-Geneviève	Pharmacognosie
DURMORT-MEUNIER	Claire	Virologie
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique
FAURE	Patrice	Biochimie
FAURE-JOYEUX	Marie	Physiologie-Pharmacologie
FOUCAUD-GAMEN	Jacqueline	Immunologie
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie Galénique
GERMI	Raphaële	Bactériologie
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie – Pharmacologie
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique
GUIRAUD	Pascale	Biologie Cellulaire et Génétique
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie
KRIVOBOK	Serge	Botanique – Cryptogamie
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique / Chimie Thérapeutique
PINEL	Claudine	Parasitologie
RAVEL	Anne	Chimie Analytique
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique
RIONDEL	Jacqueline	Physiologie - Pharmacologie
SEVE	Michel	Ens. Physique / Rech. Biochimie
TARBOURIECH	Nicolas	
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Bio-Inorganique
VILLEMMAIN	Danielle	Mathématiques / Informatique
VILLET	Annick	Chimie Analytique

PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)

ROUTABOUL	Christel	Chimie Générale
------------------	----------	-----------------

Remerciements

A Madame le Professeur Renée Grillot

pour l'honneur qu'elle me fait de présider ce jury de thèse
pour m'avoir fait aimer la pharmacie et découvrir la biologie médicale

A Monsieur le Professeur Max Maurin

pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein du laboratoire de Bactériologie sous sa
direction scientifique
pour sa grande disponibilité et ses conseils

A Monsieur le Professeur Dominique Schneider

pour son accueil au sein de l'UMR 5163 et le grand intérêt qu'il a porté à ce travail

A Monsieur le Professeur Jean-Marie Seigneurin

pour m'avoir permis d'apprendre la microbiologie au sein du laboratoire de Bactériologie
et Virologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Grenoble
pour l'honneur qu'il me fait d'accepter de juger ce travail

A Monsieur le Professeur Jérôme Etienne

pour l'honneur qu'il me fait de bien vouloir participer à ce jury de thèse

A Monsieur le Docteur Jacques Croizé

pour son enthousiasme, sa générosité et l'enseignement qu'il m'a donné de la bactériologie

A Monsieur le Docteur Pierre-Alain Falconnet

pour son soutien quotidien, ses conseils et les bons moments partagés

A Doriane Pastrello, Marie-Claude Ageron et Marie-Jeanne Chaix pour leur aide efficace en matière de commande

A Anne Signori – Schmuck pour son écoute attentive et ses conseils avisés

A Sandrine Nicod et Sylvie Aribert pour leur grande disponibilité et leur sourire inconditionnel

A Evelyne, Estelle, Nadège et Ludovic pour leur excellent accueil et leur aide

A mes co-internes, Julien, mon partenaire de DEA

Marine, pour sa bonne humeur et son aide précieuse lors des manipulations les plus longues

Catherine, Vincent, Vanessa, Anne, Céline et Virginie

A Arnaud

A mes parents

A mes grands parents

A Juliette et Claire

A Camille et Benoît

A Fanny et Rémi

A mes amis

pour le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de mes études

Sommaire

INTRODUCTION	5
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1. LE GENRE LEGIONELLA.....	8
1.1. Historique	8
1.2. Taxonomie	8
1.3. Caractères bactériologiques.....	10
1.4. Caractères génomiques	11
1.5. Ecologie.....	12
2. LEGIONELLOSES.....	17
2.1. Epidémiologie.....	17
2.2. Diagnostic.....	21
2.3. Traitement.....	23
2.4. Prévention.....	24
2.5. Surveillance épidémiologique.....	25
3. POUVOIR PATHOGENE DES LEGIONELLES	28
3.1. Facteurs de virulence chez Legionella	28
3.2. Régulation de la virulence	33
TRAVAIL PERSONNEL	38
1. OBJECTIFS.....	39
2. MATERIELS ET METHODES	40
2.1. Etude de la variabilité des séquences des gènes <i>relA</i> , <i>spoT</i> , <i>rpoS</i> et <i>rpoA</i> chez Legionella....	40
2.2. Culture de Legionella pneumophila 1 sur cellules THP-1	46
3. RESULTATS	51
3.1. Variabilité des gènes <i>relA</i> , <i>spoT</i> , <i>rpoS</i> , <i>acn</i> , <i>asd</i> , <i>rpoB</i> , <i>mip</i> et <i>dotA</i> au sein des souches <i>L. pneumophila</i> 1 Philadelphia, Paris et Lens.	51
3.2. Distribution allélique du gène <i>relA</i> au sein d'une sélection de 17 souches de Legionella.	54
3.3. Comparaison des souches Legionella pneumophila 1 Lens, Paris et 12* sur co-culture macrophagique	58
DISCUSSION	60
CONCLUSION	68
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	71
ANNEXES	81

Figures

Figure 1 . Arbre phylogénétique des Gamma Protobacteria, construit par la méthode de Neigbor-Joining d'après le séquençage de l'ARN 16S	9
Figure 2 . <i>Legionella pneumophila</i>	10
Figure 3 . Cycle de vie de <i>Legionella</i>	14
Figure 4 . Représentation schématique des caractéristiques morphologiques des phagocytoses classique et par enroulement.	15
Figure 5 . Evolution de <i>Legionella pneumophila</i> dans son environnement intracellulaire amibien.	16
Figure 6 . Répartition environnementale et clinique des Legionella en fonction de l'espèce et du séro groupe en 2002.....	19
Figure 7 . Evolution du nombre de cas de légionellose déclarés, France 1988-2004	25
Figure 8 . Structure chimique de ppGpp.	35
Figure 9 . Schéma de régulation des phénotypes propres à la transmission et à la réplication chez <i>Legionella pneumophila</i>	37
Figure 10 . Le système FRET.....	49
Figure 11 . Nombre de mutations cumulées synonymes et non synonymes codon par codon, pour les souches Lens, Paris et Philadelphia.	52
Figure 12 . Arbre phylogénétique construit par la méthode du maximum de vraisemblance à partir des séquences des huit allèles décrits pour <i>relA</i>	57
Figure 13 . Cinétique de croissance des trois souches L. pneumophila 1 Lens, Paris et 12* sur co-culture macrophagique de type THP-1.....	58

Tableaux

Tableau I . Souches de <i>Legionella</i> issues de la collection du Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Grenoble.	40
Tableau II . Oligonucléotides (5'>3').....	43
Tableau III . Résultats de l'alignement des gènes <i>rpoB</i> , <i>acn</i> , <i>asd</i> , <i>mip</i> , <i>dotA</i> , <i>relA</i> , <i>rpoS</i> et <i>spoT</i> pour les trois souches <i>L. pneumophila</i> 1 Philadelphia, Lens et Paris.	51
Tableau IV . Description des substitutions d'acides aminés mises en évidence pour les gènes <i>relA</i> , <i>rpoS</i> et <i>spoT</i> lors de la comparaison des souches <i>L. pneumophila</i> 1 Lens et Paris à la souche de référence <i>L. pneumophila</i> 1 Philadelphia.....	53
Tableau V . Ensemble des mutations observées sur les 17 souches de <i>Legionella</i>	56
Tableau VI . Comparaison des inoculums, de la pénétration intracellulaire, de la croissance et de la concentration bactérienne finale des trois souches <i>L. pneumophila</i> 1 Lens, Paris et 12* en co-culture macrophagique de type THP-1.	59
Tableau VII . Revue bibliographique des données disponibles sur les gènes séquencés à ce jour chez <i>L. pneumophila</i>	63

Abréviations

ACES : Acide N-(2-acétamido)2-amino-éthane sulfonique
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism
AFNOR : Association Française de NORmalisation
AFSSAPS : Agence Française de Sécurité SANitaire des Produits de Santé
AP-PCR : Arbitrarily Primed PCR
ARN : Acide RiboNucléique
ATCC : American Type Culture Collection
BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract
CDSC : Communicable Disease Surveillance Centre
CNRL : Centre National de Référence des *Legionella*
DDASS : Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales
DGS : Direction Générale de la Santé
DL 50: Dose Létale à 50%
EWGLI : European Working Group for Legionella Infections
FRET : Fluorescent Resonance Energy Transfert
GVPC : Glycine, Vancomycin, Polymyxin B, Cycloheximide
LLAPs : *Legionella*-like Amoebal Pathogens
LPS : LipoPolySaccharide
MLST : Multi Locus Sequence Typing
NS : Non Synonyme
PCR : Polymerase Chain Reaction
PCR-TR : PCR en temps réel
PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis
SBT : Sequence Based Typing
ST : Sequence Type
T_m : melting Temperature
UFC : Unité Formant une Colonie
UV : UltraViolet

Introduction

Le genre *Legionella* désigne un ensemble de bacilles à Gram négatif, ubiquitaires dans l'environnement aquatique et émergeant en tant que problème de santé publique dans les pays industrialisés. Le germe, dispersé sous forme d'aérosols par le biais des bains à remous, fontaines, douches ou climatiseurs devient un pathogène pulmonaire pour l'homme. Il provoque une pneumonie aiguë, la légionellose. Une espèce se distingue particulièrement en pathologie humaine : *Legionella pneumophila*, pourtant non prépondérante dans l'environnement, est responsable de 99% des cas de légionelloses. Son séro-groupe 1 recouvre 96% de ces cas (35). Pour autant, toutes les souches *L. pneumophila* de séro-groupe 1 ne possèdent pas la même virulence (102; 104; 94; 2; 35). Certaines sont épidémiques, d'autres endémiques ou même sporadiques.

Cette variabilité phénotypique au sein des *L. pneumophila* 1 nous amène à chercher des marqueurs génétiques de la virulence. Cela représente un intérêt, tant sur le plan de la connaissance des mécanismes de virulence chez *Legionella*, que sur celui des applications prophylactiques dans le cadre de l'évaluation des risques liés à la contamination d'un réseau d'eau par *L. pneumophila* 1. Plusieurs études ont tenté de corréler un polymorphisme génétique à la virulence des souches, sans succès (20; 4). Nous proposons ici l'étude des gènes *relA*, *spoT* et *rpoS* en tant que marqueur de pathogénicité. Ces trois gènes sont des régulateurs globaux, impliqués dans la réponse bactérienne aux stress environnementaux. Chez *L. pneumophila*, ils agissent sur l'alternance phénotypique, nécessaire au cycle bactérien et sont inducteurs de virulence (60).

Dans cette étude, nous évaluerons la variabilité des gènes *relA*, *rpoS* et *spoT* chez *L. pneumophila* 1 Lens, Paris et Philadelphia. Nous testerons le pouvoir discriminant de la distribution allélique de *relA* vis-à-vis de la virulence au sein d'une sélection de 17 souches. Les critères étudiés seront basés sur l'observation épidémiologique : source, clinique ou environnementale, et profil épidémiologique des souches. Parallèlement, nous réaliserons un travail préliminaire de culture des légionelles en cellules THP-1 de façon à caractériser la virulence intrinsèque de chaque souche.

Synthèse bibliographique

1. Le genre *Legionella*

Legionella est un genre bactérien récemment décrit dont la taxonomie est encore évolutive. Ce microorganisme a la particularité d'être intracellulaire facultatif. Il se développe selon un mode parasitaire au sein d'une cellule hôte : l'amibe. Cette co-évolution écologique serait à l'origine d'une certaine plasticité génomique et du caractère pathogène de *Legionella* pour toute cellule phagocytaire dont les macrophages humains.

1.1. Historique

Les premières souches de légionelles ont été mises en évidence entre 1943 et 1968 et considérées comme des rickettsies. Ces bactéries n'ont fait l'objet d'aucune étude approfondie jusqu'en 1976, date à laquelle 182 personnes logeant dans un hôtel de Philadelphie (Pennsylvanie, Etats-Unis) présentèrent des infections respiratoires provoquant 34 décès. La plupart des sujets atteints participaient à la 56ème convention de la légion américaine si bien que la pneumopathie fut nommée "la maladie des légionnaires" (47). L'enquête attribua l'épidémie à une contamination des systèmes de climatisation de l'hôtel. L'apparition des réseaux de distribution d'eau chaude, de la climatisation, des bains à remous en faveur d'un certain confort dans les pays industrialisés, a généré des niches écologiques favorables à la multiplication et la propagation des légionelles. Ce germe émerge actuellement en tant que problème de santé publique dans ces pays.

1.2. Taxonomie

C'est en 1979 que furent créés par Brenner *et al.* la famille des *Legionellaceae*, le genre *Legionella* et l'espèce *Legionella pneumophila*. La légionelle isolée à Philadelphie constitue la souche type de cette dernière espèce. Elle est enregistrée dans la collection de souches américaine sous la référence ATCC (American Type Culture Collection) 33152. La famille des *Legionellaceae* appartient à la subdivision gamma de la classe des

Proteobacteria (49). Phylogénétiquement, l'espèce la plus proche de *Legionella pneumophila* est *Coxiella burnetii* (figure 1).

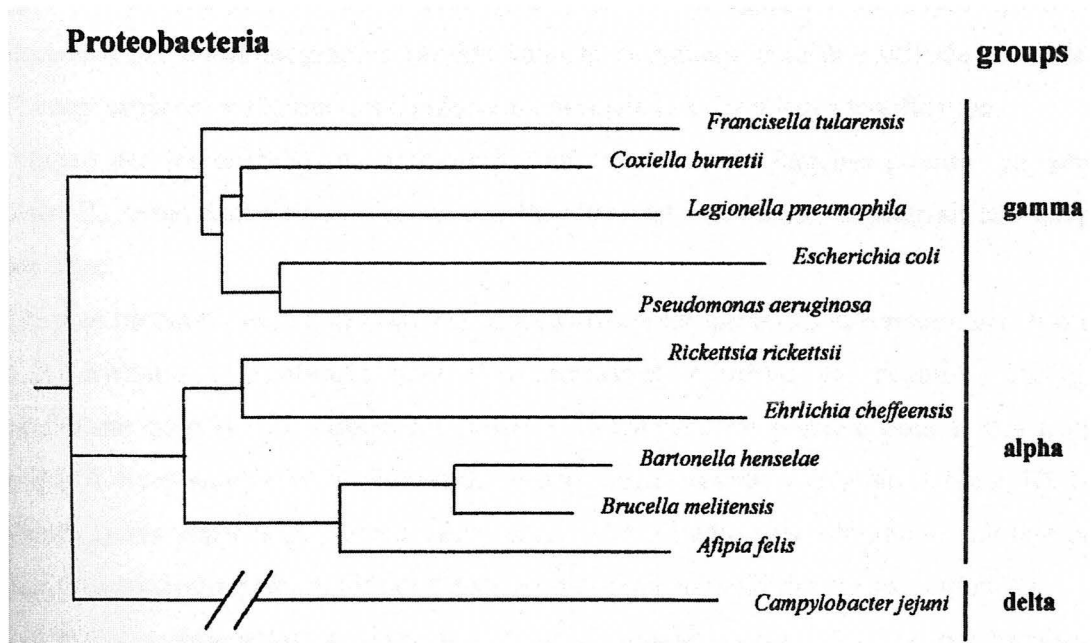


Figure 1. Arbre phylogénétique des Gamma Protobacteria, construit par la méthode de Neigbor-Joining d'après le séquençage de l'ARN 16S (88).

Cette nouvelle famille a immédiatement suscité de nombreux travaux et, dès 1980, quatre nouvelles espèces ont été décrites. Actuellement, elle comprend un genre unique et rassemble 49 espèces différentes dont une, *Legionella pneumophila*, est divisée en 3 sous-espèces : *L. pneumophila subspecies pneumophila*, *L. pneumophila subspecies fraseri* et *L. pneumophila subspecies pascullei* (16; 101). On définit également 71 sérogroupes (42; 101). Le nombre d'espèces et de sérogroupes est en constante augmentation (33; 11; 83; 101).

Plusieurs souches de légionelles ne sont pas cultivables sur gélose. Qualifiées de LLAPs (*Legionella*-Like Amoebal Pathogens), elles pourraient toutefois correspondre à de nouvelles espèces au sein du genre *Legionella* (13). Ainsi en mai 2001, Adeleke *et al.* ont caractérisé les espèces *Legionella drozanskii*, *Legionella fallonii* et *Legionella rowbothamii* (1).

Les techniques d'hybridation ADN - ADN ont mis en évidence un faible niveau d'homologie entre certaines espèces du genre *Legionella*. Suite à cette observation, deux nouveaux genres ont été proposés et reconnus par l'International Committee on Systematic Bacteriology : *Fluoribacter* et *Tatlockia* (54) Toutefois, cette distinction n'est pas justifiée par le phénotype. Elle est même contredite par le séquençage de l'ARN 16S qui suggère l'existence d'un genre unique (10). Par conséquent, ces nouveaux genres restent peu employés.

1.3. Caractères bactériologiques

Les légionelles sont des bacilles à Gram négatif faiblement colorés par la safranine et mesurant de 0,3 à 0,9 μm de diamètre sur 1,5 à 5 μm de longueur. Elles sont mobiles grâce à la présence d'un ou de plusieurs flagelles polaires, subpolaires ou latéraux (figure 2). Cette mobilité est toutefois difficile à mettre en évidence et son expression est fonction des facteurs environnementaux.

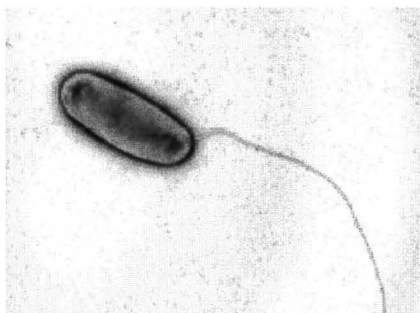


Figure 2 . *Legionella pneumophila*.

Grâce à la microscopie électronique, on visualise ici un flagelle polaire, responsable de la mobilité de la bactérie.

Sur un plan biochimique, ces bactéries se caractérisent par un métabolisme non fermentatif, une catalase positive (parfois faiblement), l'absence de nitrate réductase et d'uréase.

Leur culture est obtenue sur milieu enrichi en L-cystéine et en fer sous une atmosphère aérobie stricte. Le milieu de choix est la gélose BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) contenant de la cystéine, de l'extrait de levure, qui constitue un apport nutritif riche, du fer et de l' α -cétoglutarate, tout deux favorables à la croissance

bactérienne, un tampon ACES (Acide N-(2-acétamido)2-amino-éthane sulfonique) qui maintient le pH dans la fourchette 6,85 – 6,95 adaptée à la culture de *Legionella* et du charbon, capteur des toxines accumulées dans la gélose au cours de son autoclavage ou de sa conservation. La croissance bactérienne est lente avec un temps de doublement de 3,9 heures. Elle peut être optimisée par l'ajout de 2,5 à 5% de CO₂ dans l'atmosphère d'incubation. La température idéale pour la culture est comprise entre 35 et 37°C. Les colonies obtenues se caractérisent par une couleur grise, une texture muqueuse et un aspect en verre brisé typique.

Il est possible de cultiver *Legionella* en présence d'amibes. L'espèce *Acanthamoeba castellanii* est très utilisée (29; 28). La pathogénicité d'une souche sera étudiée préférentiellement sur des cellules d'origine humaine, monocytaires (THP-1, U937) ou épithéliales (A549, HeLa), ou encore *in vivo* sur modèle animal (17; 53; 77; 2).

1.4. Caractères génomiques

Les génomes de trois souches de *Legionella pneumophila* sont entièrement séquencés : deux souches françaises, les souches Paris et Lens, et la souche de référence, Philadelphia (24; 26). Chacune porte le nom de la ville dans laquelle elle a été mise en évidence. Elles appartiennent toutes les trois au séro groupe 1.

Le génome de *L. pneumophila* correspond à un chromosome circulaire d'environ 3,7 Mégabases. Son ADN se compose de 38% de bases G-C. Chacune des trois souches séquencées possède un ou plusieurs plasmides. L'analyse des séquences prédit la présence d'environ 3 000 gènes.

Quatre-vingts pour cent d'entre eux codent pour des protéines possédant des homologues chez d'autres organismes (orthologues). Soixante pour cent de ces orthologues ont des fonctions connues. On peut donc prédire ces mêmes fonctions chez *L. pneumophila*.

On observe que 62 gènes codent pour des protéines proches de celles des eucaryotes, notamment au niveau des motifs d'interaction protéique. C'est le maximum observé chez les bactéries déjà séquencées. Cette similarité reflète la co-évolution des légionelles avec des cellules eucaryotes, en particulier avec des protozoaires aquatiques. La présence de telles protéines suggère que *Legionella* est capable d'interagir avec son hôte et de moduler les fonctions de la cellule hôte pour les détourner à son avantage (24).

Chaque souche possède 9 à 13% de protéines spécifiques. C'est un pourcentage important pour des légionelles appartenant à la même espèce. Les plasmides possèdent également une certaine spécificité de souches et pourraient intervenir dans la virulence et la plasticité de cette espèce (12).

1.5. Ecologie

1.5.1. Bactérie intracellulaire d'amibes

Les légionelles sont des bactéries adaptées à des conditions particulières de croissance. Leur environnement idéal est celui intracellulaire de l'amibe (65). Aucune multiplication extracellulaire de *Legionella* n'a pu être observée sur des modèles dépourvus de cellules phagocytaires (95). Sa culture en milieu axénique n'a été rendue possible que par la confection d'un milieu de culture artificiel, enrichi en L-cystéine.

Les cellules hôtes de ces bacilles, les amibes, sont des protozoaires rhizopodes. Les protozoaires sont des organismes unicellulaires appartenant au règne des protistes. Ce règne encore mal défini et très disparate, correspond aux premières cellules eucaryotes. Il regroupe les ancêtres des végétaux, des mycètes et des animaux. Les protozoaires se rapprochent plutôt de ces derniers, de part leur mode de nutrition : ce sont des prédateurs de bactéries.

Les amibes appartiennent au phylum des rhizopodes, caractérisé par le déplacement de la cellule grâce à l'émission de pseudopodes. La forme mobile, végétative, peut se transformer en forme de résistance immobile, le kyste, lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables. Les amibes colonisent divers écosystèmes composés de sols humides ou d'eau douce.

Legionella pneumophila infecte et se multiplie dans les rhizopodes du genre *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmanella*, *Naeglaeria*, *Vahlkampfia* (40). Les protozoaires ciliés tels que *Tetrahymena* y sont également réceptifs (43). Cette faible spécificité d'hôte caractérise cette espèce et ne se retrouve pas chez les autres légionelles. Cette adaptabilité supérieure peut expliquer la prédominance de *Legionella pneumophila* en pathologie humaine.

Le bacille parasite évolue dans le même écosystème que sa cellule hôte. On le retrouve dans les sols humides et les eaux douces de surface (lacs, étangs, rivières), de manière ubiquitaire (46). *L. pneumophila* se multiplie à une température comprise entre 25 et 42°C avec un optimum à 35°C (71). Les protozoaires jouent un rôle de véhicule et assurent la propagation des légionelles vers de nouveaux milieux aquatiques. Ainsi, elles sont présentes dans les environnements hydriques artificiels tels que les bains, douches, réseaux d'eau potable et tours aéro-réfrigérantes.

Lorsque les conditions environnementales sont délétères, les légionelles intracellulaires bénéficient de la résistance du kyste amibien. Elles peuvent ainsi supporter de fortes variations de pH (5,5 à 9), de température (5 à 63°C), l'action des biocides et des désinfectants (63).

1.5.2. Cycle de vie

Le cycle de vie de *Legionella* se constitue d'une alternance entre multiplication intracellulaire et survie extracellulaire. A ces deux phases évolutives distinctes correspond un dimorphisme bactérien qui permet au bacille de résister aux variations qualitatives de son environnement. L'ajustement physiologique du phénotype microbien s'effectue en réponse à des signaux moléculaires selon un programme génétique propre à la bactérie. Ce mécanisme est à distinguer d'une régulation métabolique et se rapproche plus d'un phénomène de différenciation. Il sera détaillé dans le paragraphe « régulation de la virulence », page 33.

Le cycle de vie de *Legionella* s'organise donc en deux phases (figure 3). D'abord une phase d'abondance nutritive intracellulaire. La situation est alors favorable à la multiplication bactérienne. *Legionella* revêt un phénotype répliatif, caractérisé par une petite taille et une paroi semblable à celle des bactéries à Gram négatif. L'augmentation du nombre de bacilles provoque alors l'épuisement nutritif du milieu intracellulaire. Cette nouvelle situation de carence induit la transformation des bacilles répliatifs en bacilles transmissibles. Les traits liés à la multiplication sont inhibés alors que les caractères lytiques et infectieux de la bactérie sont activés. Ce phénotype, favorable à la recherche d'un nouvel hôte, se caractérise par l'acquisition d'un flagelle, la résistance au stress osmotique, un pouvoir cytotoxique, la capacité d'échapper à la digestion lysosomale et une forte infectiosité. Après une certaine maturation, les légionelles provoquent la lyse de leur cellule hôte et se trouvent libres dans l'eau. Elles survivent dans l'eau et plus

particulièrement dans les biofilms jusqu'à la rencontre d'une nouvelle niche de réplication : une nouvelle amibe. Intracellulaire, *Legionella* retrouve une forme répliquative et entame un nouveau cycle.

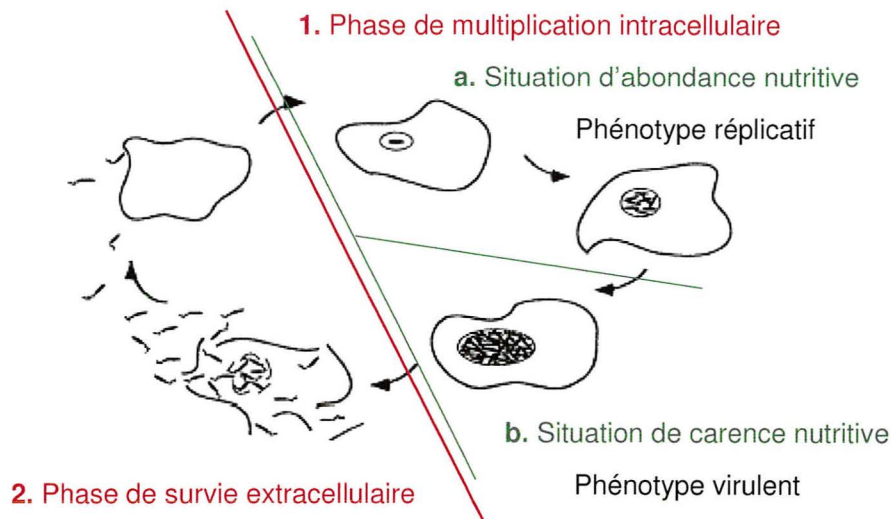


Figure 3 . Cycle de vie de *Legionella*

Le cycle de vie de *Legionella* est constitué d'une alternance de deux phases. La première est une phase de multiplication intracellulaire au cours de laquelle le germe se trouve successivement dans une situation d'abondance puis de carence nutritive, du fait de l'augmentation du nombre de bacilles dans la vacuole répliquative. Ce changement des conditions de croissance intracellulaire provoque une transformation phénotypique de la bactérie avec acquisition des traits de virulence (flagelle, cytotoxicité, infectiosité, résistance au choc osmotique). Les légionelles intracellulaires sont alors capables de lyser leur cellule hôte et vont entamer une phase de survie extracellulaire. Grâce à l'acquisition d'un flagelle, elles sont capables de trouver une nouvelle cellule hôte et de commencer un nouveau cycle.

L'évolution intracellulaire de la bactérie dans l'amibe se déroule comme suit. L'espèce *Legionella pneumophila* interagit avec le protozoaire par l'intermédiaire de pili de type IV et une lectine Galactose / N-acétylgalactosamine (116). La pénétration microbienne se fait ensuite par un mécanisme de phagocytose, classique ou par enroulement (figure 4). Dans le deuxième cas, on parle de « coiling phagocytose ».

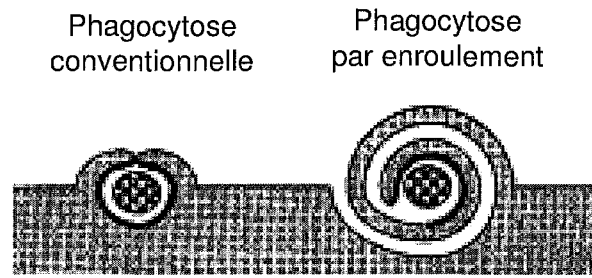


Figure 4 . Représentation schématique des caractéristiques morphologiques des phagocytoses classique et par enroulement.

Au cours de la phagocytose conventionnelle, les particules sont internalisées de manière spécifique par deux pseudopodes en vis-à-vis, guidés par les interactions récepteur – ligand. La phagocytose par enroulement, par contre, fait appel à un pseudopode unique, unilatéral qui s’enroule autour de sa cible en formant plusieurs spires.

Le bacille entre seul ou par paire dans la cellule hôte. Le phagosome formé évolue de manière atypique sous l’influence de la bactérie (figure 5). Tout d’abord, *Legionella* inhibe la fusion avec les lysosomes cytoplasmiques. Elle empêche ainsi l’acidification et l’oxydation massive de son environnement. La vacuole, contenant les microorganismes va ensuite recruter successivement des vésicules cytoplasmiques, les mitochondries puis les ribosomes liés au réticulum endoplasmique (93). La proximité de ces différents organelles assure à la bactérie un environnement propice à sa multiplication. Cette vacuole, ainsi entourée, est dite réplivative. Après 36 à 48 heures d’infection, les légionelles emplissent la quasi totalité de la cellule hôte et sont au nombre de 10^4 . Les mécanismes conduisant à la lyse des protozoaires sont inconnus. Ils sont attribués, de manière hypothétique, à la surcharge bactérienne et à l’altération des organelles intracellulaires (93).

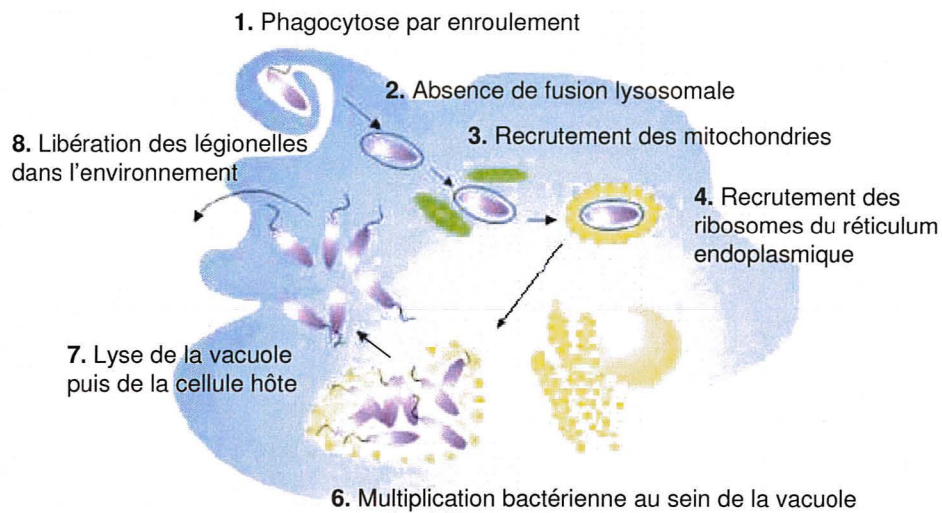


Figure 5. Evolution de *Legionella pneumophila* dans son environnement intracellulaire amibien.

D'après Swanson *et al.*, 2000 (119)

1.5.3. Pathogène accidentel de l'homme

Les amibes sont des phagocytes au même titre que de nombreuses cellules, notamment certaines cellules humaines telles que les macrophages pulmonaires. A cause de cette similarité, les amibes constituent un véritable réservoir de pathogènes pour l'homme (62). Macrophages et amibes possèdent plusieurs caractères communs, dont les récepteurs de surface. Ainsi les capacités infectieuses de *Legionella* sont transposables de l'amibe chez le macrophage. L'évolution intracellulaire de la bactérie se produit selon des mécanismes proches au sein des deux types de phagocytes. Quelques spécificités sont toutefois décrites pour les cellules eucaryotes concernant l'infection et la lyse cellulaire (72; 58).

En plus de ce rôle de réservoir de pathogène, les amibes pourraient être le berceau de l'évolution microbienne. En effet, l'environnement protozoaire exerce sur ses parasites intracellulaires une certaine sélection naturelle. Celle-ci provoque l'émergence des bactéries les plus adaptées à l'infection des cellules phagocytaires (62).

L'adaptation de *Legionella* aux macrophages montre néanmoins des limites. Il faut souligner que le bacille ne se transmet pas de personne à personne. Il se distingue ainsi des autres pathogènes respiratoires tels que *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* ou encore *Mycobacterium tuberculosis*. Chez l'homme, *L. pneumophila* est en situation d'impasse et ne peut assurer sa survie en allant coloniser une nouvelle personne. Les mutations acquises en réponse à la pression sélective exercée par le macrophage et favorables à la multiplication et la survie de la bactérie pourront de ce fait difficilement persister au sein du génome de l'espèce (119).

2. Légionelloses

2.1. Epidémiologie

2.1.1. Mode de contamination

L'homme se contamine par l'inhalation d'aérosols aqueux chargés en légionelles et constitués de gouttelettes de diamètre inférieur à 5 µm c'est-à-dire capable d'atteindre les alvéoles pulmonaires (117). Tout générateur d'aérosols est potentiellement une source de contamination. On citera notamment les douches, les systèmes de climatisations et les tours aéro-réfrigérantes, les rampes d'arrosage automatique, les bains bouillonnants, les humidificateurs, les équipements médicaux pour les soins respiratoires, les eaux thermales et les fontaines décoratives. Parmi toutes ces sources, les circuits d'eau chaude sanitaire représentent la cause la plus fréquente d'infection.

Ni portage sain ni contamination interhumaine ne sont à ce jour documentés (40).

2.1.2. Facteurs de risques

2.1.2.1. *Facteurs liés à l'hôte*

Les légionelles sont des pathogènes opportunistes. Elles s'expriment préférentiellement chez les patients au système immunitaire affaibli ou présentant les facteurs de risques suivants : un âge supérieur à 50 ans, le sexe masculin (ratio

homme/femme de 2,5), le tabagisme (seul facteur favorisant dans 32% des cas), l'éthylisme, la présence de pathologies sous jacentes telles que la bronchopneumopathie chronique obstructive, l'emphysème, les cancers pulmonaires ou hématologiques, l'immuno-suppression clinique ou médicamenteuse et enfin, la fréquence de l'exposition à des sources de contamination (voyages, hôtels, centres de loisirs ou de soins) (23; 22).

2.1.2.2. Facteurs bactériens

Les caractéristiques bactériennes statistiquement reliées au déclenchement de la maladie sont l'espèce et le sérotype. Ce sont les deux critères qui sont actuellement corrélés à la pathogénicité d'une souche grâce aux données épidémiologiques.

Sur 49 espèces de *Legionella*, 20 sont retrouvées en clinique : *Legionella anisa*, *Legionella birminghamensis*, *Legionella bozemanii*, *Legionella cincinnatiensis*, *Legionella dumoffii*, *Legionella feeleii*, *Legionella gormanii*, *Legionella hackeliae*, *Legionella israelensis*, *Legionella jordanis*, *Legionella lansingensis*, *Legionella longbeachae*, *Legionella lytica*, *Legionella maceachernii*, *Legionella micdadei*, *Legionella oakridgensis*, *Legionella pneumophila*, *Legionella sainthelensi*, *Legionella tucsonensis*, *Legionella wadsworthii* (41; 101).

La plus fréquemment isolée est *Legionella pneumophila*, responsable de 99% des légionelloses déclarées en France (35). Au sein de cette espèce, le sérotype 1 est le plus fréquemment isolé (96%).

Cette distribution des espèces et sérotypes en pathologie humaine n'est pas celle que l'on retrouve dans l'environnement (Figure 6). Les *Legionella non pneumophila* ont une représentation au sein des isolats cliniques qui est vingt fois moins importante que celle observée parmi les isolats environnementaux (1% contre 25%, respectivement). Les *Legionella pneumophila non 1* sont en quantité importante dans l'environnement (47% des isolats), donc plus fréquemment au contact de l'homme. Cependant, elles ne correspondent qu'à 3% des isolats cliniques. L'espèce *Legionella pneumophila 1* a une variation inverse de sa prévalence avec une prépondérance chez l'homme (28% des isolats environnementaux contre 96% des isolats cliniques).

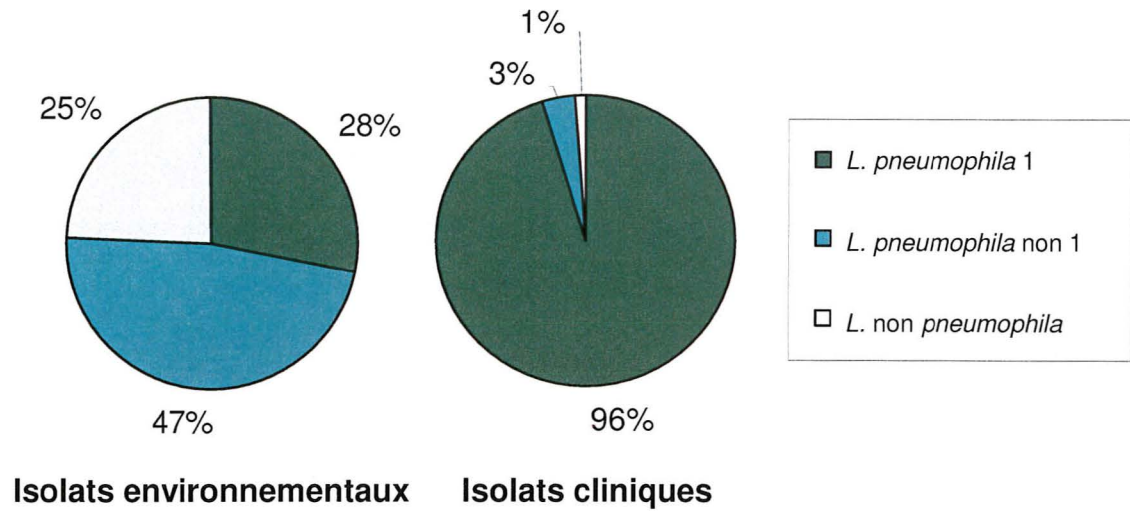


Figure 6. Répartition environnementale et clinique des Legionella en fonction de l'espèce et du sérotype en 2002 (35).

Cette inadéquation entre les répartitions environnementales et cliniques signifie que la présence du germe chez l'homme ne suffit pas à déclencher une maladie. Une variable propre à la souche infectante intervient : il correspond à son pouvoir pathogène (2; 35). *Legionella pneumophila* 1 est vraisemblablement le groupe le plus pathogène. Cette hypothèse concorde avec les résultats de deux études. L'une montre que les *L. pneumophila* 1 sont plus infectieuses et plus aptes à se multiplier en intracellulaire que les autres espèces (2). L'autre souligne que les infections dues aux souches non *L. pneumophila* touchent principalement les populations immunodéprimées (94).

Les données épidémiologiques doivent cependant être nuancées. Il existe un biais introduit par les techniques du diagnostic bactériologique des légionelloses. En effet, la culture des légionelles sur milieu BCYE ne permet pas une croissance égale de toutes les espèces. *Legionella pneumophila* est l'espèce la plus facilement isolée (80). De la même façon, la recherche de l'antigène urinaire spécifique de *Legionella pneumophila* 1 est une pratique qui privilégie le diagnostic du sérotype 1 par rapport aux autres sérotypes de l'espèce. On peut par conséquent supposer que la prévalence relative de *Legionella pneumophila* est surestimée.

Au sein du séro groupe 1, il existe encore une grande variété de souches. Celles-ci sont typées grâce à la technique d'électrophorèse en champ pulsé lors des enquêtes épidémiologiques. On définit ainsi les pulsotypes.

Le suivi au long cours de l'épidémiologie de chaque pulsotype permet aujourd'hui de décrire différents profils. Les souches dites sporadiques ont un pulsotype unique et sont sans lien épidémiologique entre elles. Les souches endémiques partagent le même pulsotype et causent plusieurs cas de légionelloses non reliés épidémiologiquement. Enfin, les souches épidémiques possèdent le même pulsotype et sont responsables de plusieurs cas cliniques dans un même secteur, sur une courte période.

Pour exemple, nous décrivons les profils épidémiologiques de trois pulsotypes, dans leur ordre d'apparition. La souche Philadelphia est à l'origine de la première épidémie de légionellose en 1976, lors d'un congrès de la Légion Américaine à Philadelphie. 182 personnes sont atteintes sur 4 400 participants. Vingt neuf personnes décèdent. Le système de climatisation de l'hôtel est à l'origine de la dispersion aérienne de la bactérie.

La souche Paris colonise le réseau de distribution en eaux de Paris depuis 1987. Elle montre ainsi une certaine stabilité génétique et semble donc particulièrement adaptée à la survie dans l'environnement. Elle est mise en cause pour 13% des cas de légionelloses en France autant communautaires (40,5%) que nosocomiales (52,4%) (3). *Legionella pneumophila* Paris peut être à l'origine d'épidémies réduites, jusqu'à 10 cas, ou de cas sporadiques.

La souche Lens a provoqué une épidémie de 89 cas dans le Pas-de-Calais entre le 5 novembre et le 22 janvier 2003. Dix sept décès sont survenus. Le profil de ce clone était alors inconnu au Centre National de Références de *Legionella* (CNRL). La contamination aérienne a été attribuée aux systèmes de refroidissement d'une entreprise. Cette épidémie de Légionellose est la plus importante jamais décrite en France, en terme de durée, d'extension géographique et de nombre de cas impliqués (91).

2.1.3. Fréquence

La légionellose concerne un ensemble de territoires limités, composé de l'Europe, des Etats-Unis et de l'Australie. Ce sont les pays qui sont d'une part, touchés par l'émergence de cette maladie, liée à la modernisation des réseaux d'eau et d'autre part, dont l'organisation sanitaire permet d'effectuer une surveillance épidémiologique.

En France, la légionellose est responsable de 5 à 15% des pneumonies communautaires nécessitant une hospitalisation (117; 41). La prévalence des anticorps anti-*Legionella pneumophila* sérotype 1 (titre supérieur ou égal à 256) varie de 1 à 16% dans la population adultes en bonne santé, selon les estimations réalisées (41). Mille deux cent deux cas de légionelloses ont été déclarés au cours de l'année 2004, soit une incidence de 2 cas pour 100 000 habitants (22). Le nombre réel de légionelloses est estimé entre 2 000 et 3 000 cas annuels. Le taux d'attaque est plus faible lors des épidémies de maladie des légionnaires (0,1 à 5%) que lors de la fièvre de Pontiac (95%). La mortalité de la maladie des légionnaires en 2004 est de 14% (22).

2.2. Diagnostic

Le diagnostic de certitude est défini par la présence d'éléments cliniques et/ou radiologiques associés à la confirmation microbiologique de l'infection à *Legionella*.

2.2.1. Clinique

La légionellose peut se présenter sous deux tableaux cliniques distincts : la maladie des légionnaires, pneumonie aiguë et la fièvre de Pontiac, bénigne. Par ailleurs, certains patients font une séroconversion vis-à-vis de *Legionella* tout en restant asymptomatiques (15). D'une manière générale, le tableau clinique sera d'autant plus marqué que la réponse immune du sujet sera inadaptée.

La fièvre de Pontiac correspond à un syndrome pseudogrippal peu spécifique et sans gravité. C'est l'expression clinique la plus fréquente. Elle survient chez les personnes dont la réponse immune permet de contrôler l'infection. Le diagnostic ne sera établi qu'en période d'épidémie. Après une incubation de 36 heures, le patient présente une fièvre avec myalgies, toux, malaise et maux de tête mais pas de pneumopathie. La guérison survient en deux à cinq jours.

La maladie des légionnaires est une infection pulmonaire aiguë, qui survient le plus souvent en présence de facteurs de risques. Le temps d'incubation est de deux à dix jours. Les premiers symptômes sont une fièvre accompagnée de toux et de douleurs thoraciques. On observe également des myalgies, une diarrhée, de la confusion. Les tableaux digestifs et neurologiques peuvent s'accroître avec des douleurs abdominales, des vomissements et

des nausées ainsi que l'apparition d'un délire, d'une désorientation et d'une somnolence. Les complications les plus fréquentes sont l'insuffisance rénale aiguë et l'insuffisance respiratoire irréversible. Ce tableau est non spécifique et ne permet pas de différencier une légionellose d'une autre pneumonie (36).

On décrit également des manifestations extrapulmonaires avec atteintes hématologiques, neurologiques (coma), cardiaques (myocardite, péricardite, endocardite), musculaire ou digestives (péritonites, pancréatites).

En raison du caractère bénin de la fièvre de Pontiac et de la rareté de son diagnostic, le terme de « légionellose » désigne le plus souvent la maladie des légionnaires.

2.2.2. Biologie

Certains paramètres biologiques sont perturbés de manière non spécifique. On observe une inflammation avec hyperleucocytose, protéine C réactive élevée et ferritine augmentée. Les fonctions pulmonaires, hépatiques et rénales peuvent être touchées avec respectivement une hypoxémie, une cytolysé hépatique, et un bilan rénal associant hyponatrémie, hypophosphatémie, protéinurie et hématurie.

L'examen bactériologique des prélèvements bronchiques, urinaires et sanguins du patient permet de déterminer l'étiologie de la pneumonie. Les examens disponibles sont : la culture sur gélose BCYE, l'immunofluorescence directe, la mise en évidence d'antigène spécifique de *Legionella pneumophila* 1 dans les urines, la sérologie et la détection de l'ADN bactérien par amplification génomique (PCR).

L'isolement de *Legionella* par culture de sécrétions bronchiques sur milieu spécifique BCYE constitue l'examen de référence qui devrait être réalisé de façon systématique. Toutefois, sa sensibilité est faible, de l'ordre de 20% (22).

La détection d'antigènes solubles de *Legionella pneumophila* dans les urines, par des techniques immuno-enzymatiques ou immuno-chromatographiques, est spécifique du sérotype 1 (à presque 100%). Ces méthodes rapides (réalisation en moins de 24 heures) permettent un diagnostic précoce dès le début des signes cliniques. Contrairement à la culture, la mise en place d'un traitement antibiotique adapté n'influence pas le résultat. La sensibilité de ces tests est proche de 90% pour les infections à *L. pneumophila* 1. En 2004, 86% des 1 202 cas déclarés en France ont été diagnostiqués par un test de détection de l'antigène urinaire (22).

L'immunofluorescence directe peut permettre de révéler la présence de *Legionella pneumophila* 1. Elle est réalisable dans les sécrétions bronchiques (lavage broncho-alvéolaire, brossage). Sa sensibilité et sa spécificité médiocres ont amené à abandonner ce test.

La sérologie est considérée comme positive lorsqu'on observe une séroconversion ou une augmentation d'un facteur 4 des titres anticorps mesurés par immunofluorescence indirecte entre deux sérums prélevés à au moins 15 jours d'intervalle. Seule la sérologie de *Legionella pneumophila* 1 est reconnue au niveau international. La spécificité d'un titre élevé isolé est médiocre d'où une mauvaise valeur prédictive positive. En 2004, 12,5% des cas déclarés ont été diagnostiqués par une sérologie positive (22).

La PCR est une méthode rapide qui commence à être utilisée en routine pour la détection de l'ADN de *Legionella*, notamment au niveau des sécrétions bronchiques.

Il y a confirmation microbiologique du diagnostic si *Legionella* est isolée par culture dans un prélèvement des voies respiratoires, s'il y a présence d'antigènes solubles dans les urines, ou encore si le titre des anticorps augmente d'un facteur 4 avec un deuxième titre minimum de 128.

2.3. Traitement

Les molécules actives sur ce germe appartiennent à la famille des macrolides (érythromycine, spiramycine) et des fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine, ofloxacine). La rifampicine, également efficace, n'est plus utilisée en raison du risque d'émergence de résistance (99). Une pneumonie de gravité légère ou modérée sera traitée par érythromycine 1g *per os* trois fois par jour pendant deux à trois semaines selon les recommandations de l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé). En pratique, les fluoroquinolones sont les antibiotiques les plus utilisés en première intention en raison de leur toxicité réduite et d'une excellente diffusion tissulaire (107). Pour les cas sévères ou chez un patient immunodéprimé, l'association d'antibiotiques est conseillée avec allongement du temps de traitement à 30 jours et utilisation de la voie intraveineuse en début de traitement. La supériorité de l'efficacité d'une bithérapie n'est cependant pas démontrée actuellement (107).

2.4. Prévention

Il n'existe pas de vaccin contre la légionellose.

Des mesures préventives sont mises en place dans un contexte de santé publique. Les désinfections massives permettent de faire disparaître la contamination d'un milieu par *Legionella*. Cependant, cette éradication reste provisoire. Elle est souvent rapidement suivie d'une recolonisation. La réduction des risques passe donc par un entretien au long cours des points d'eau en vue de limiter la prolifération bactérienne. Cette prévention s'appuie sur l'expertise des structures aquifères, leur nettoyage et leur désinfection.

Sur toute installation à risque, les pouvoirs publics recommandent de pratiquer la recherche de *Legionella*. La circulaire d'avril 2002, DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n°2002/243, définit comme installation à risque « une installation susceptible d'exposer des personnes à des aérosols d'eau contaminée inférieurs à 5µm ». Ce sont les réseaux d'eau chaude sanitaires, les tours aéro-réfrigérantes, les bains à remous et bains à jets, les systèmes de climatisations et les fontaines décoratives. La fréquence des contrôles recommandée est d'une fois par an. Le seuil d'alerte est de 10³ UFCs/L, sauf pour les bains à remous (50 UFCs/L). Lorsqu'il s'agit d'une utilisation saisonnière, il faut être particulièrement vigilant au moment de la réouverture des établissements.

Dans le cas des établissements de santé, les services accueillant des patients « à hauts risques » sont soumis à des contrôles semestriels avec un seuil d'alerte à 50 UFCs/L. Les eaux de bains et les bains à jets y seront testés une fois par mois avec le même seuil d'alerte. Il existe également une réglementation particulière pour les tours aéroréfrigérantes.

Le non-respect de ces recommandations peut, en cas de contamination d'une installation à risque, engager la responsabilité civile, voire pénale de l'exploitant de l'installation. La recherche et le dénombrement des *Legionella* dans l'eau sont effectués selon une méthode normalisée AFNOR T90-431. Ils nécessitent le prélèvement d'un litre d'eau, un délai d'acheminement de moins de 24 heures à température régulée entre +2°C et +8°C, la concentration et la décontamination de l'échantillon, sa mise en culture sur milieu sélectif et la lecture du nombre d'UFCs à trois, cinq et dix jours.

Ces mesures de prévention et de lutte doivent s'accompagner de la vigilance nécessaire de la part des médecins généralistes et des services de santé de la communauté afin de pouvoir identifier les cas de légionellose.

2.5. Surveillance épidémiologique

2.5.1. Réseau de surveillance

La surveillance de la légionellose en France repose sur plusieurs systèmes complémentaires.

La déclaration des cas est obligatoire depuis 1987. A partir de cette date, le système de déclaration a évolué progressivement, notamment en 1997 avec la re-définition des cas, une nouvelle fiche de déclaration, une modification du signalement des cas, et la diversification des sources d'information. Aujourd'hui, une double déclaration est réalisée par le clinicien et le biologiste à la DDASS (Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales) du département d'hospitalisation (Journal Officiel n° 110 du 13 mai 1999). Ces adaptations ont permis une nette augmentation du taux de déclaration. Il était estimé à 10% en 1995 puis 33% en 1998 (5). La figure 7 montre une amélioration continue de 1996 à 2004.

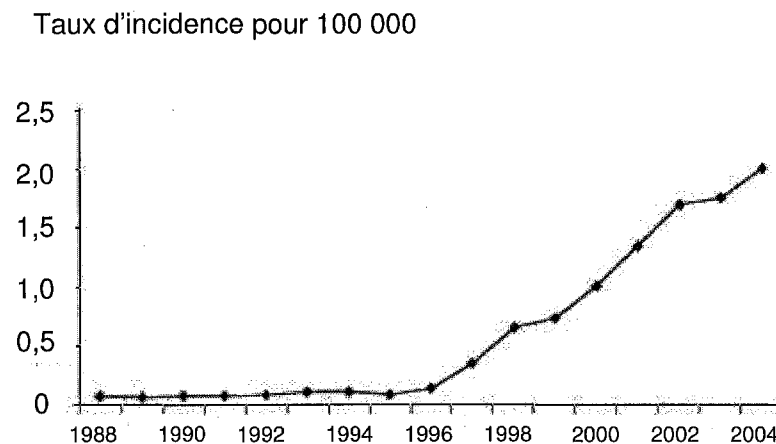


Figure 7 . Evolution du nombre de cas de légionellose déclarés, France 1988-2004 (22)

Au sein des établissements hospitaliers, les Comités de Lutte contre les Infections Nosocomiales sont chargés de la surveillance et de la prévention des légionelloses nosocomiales.

A l'échelle nationale, le Centre National de Référence des *Legionella* contribue à la surveillance épidémiologique. Il a une mission d'expertise biologique, avec la mise en œuvre des techniques de typage moléculaire sur des isolats cliniques ou environnementaux et l'entretien d'une collection bactérienne.

Enfin, la France participe à un réseau européen de surveillance des légionelloses (EWGLI pour European Working Group for Legionella Infections), en fournissant des informations sur les cas de légionellose acquis lors de voyages en France ou à l'étranger. Ce réseau, créé en 1987, est coordonné par le centre anglais de surveillance des maladies transmissibles (CDSC pour Communicable Disease Surveillance Centre). Vingt-neuf centres collaborateurs dans 25 pays participent à la déclaration des cas.

L'outil principal de ce réseau de surveillance est le typage moléculaire des souches.

2.5.2. Typage moléculaire des souches

Le typage des *Legionella* permet de relier entre eux les isolats cliniques et environnementaux lors d'une épidémie et de localiser la source de contamination.

Toutes les méthodes de typage des légionelles sont basées sur l'étude du génome bactérien, soit dans sa globalité (Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)), soit de manière limitée à une sélection de gènes (Multi Locus Sequence Typing (MLST), Sequence Based Typing (SBT)). Les techniques de typage par l'étude du phénotype bactérien sont insuffisantes.

L'analyse des profils de restriction de l'ADN bactérien total par électrophorèse en champ pulsé constitue la technique de référence. C'est en effet la méthode de typage la plus discriminante (48). Cependant, elle reste difficile à mettre en œuvre : elle est longue (quatre jours) et coûteuse de par les équipements qu'elle requiert. Par ailleurs, cette méthode présente l'inconvénient majeur d'une faible reproductibilité inter-laboratoire.

Les possibilités d'amplification génomique ont permis de mettre en place d'autres méthodes de typage basées sur les profils électrophorétiques. La technique AFLP fait appel à une restriction génomique enzymatique puis la ligation des fragments obtenus avec des fragments nucléotidiques de séquence connue qui permettront l'amplification de l'ensemble. L'AP-PCR utilise directement l'amplification aléatoire de fragments génomiques via l'utilisation d'amorces dégénérées.

Le MLST et le SBT apportent une amélioration notable par rapport à ces techniques de typage usuelles en faisant appel au séquençage. Ces méthodes se basent sur l'analyse des séquences nucléotidiques, données précises, reproductibles et accessibles via internet. Cette évolution des techniques répond au besoin des structures de surveillance internationale telle que EWGLI, d'échanger les données du typage moléculaire.

Le MLST se base sur le séquençage nucléotidique d'une sélection de gènes impliqués dans des fonctions dites de ménage. Ces gènes codent pour des protéines majeures et sont par conséquent très conservés. Cette technique a été mise en oeuvre pour étudier les phénomènes d'évolution à long terme chez *Staphylococcus aureus* ou la virulence chez *Streptococcus pneumoniae* (39; 57).

Le SBT est introduit par Gaia *et al.* comme variant du MLST (51). Les gènes dits de ménage sont remplacés par des gènes impliqués dans des activités de régulation ou de virulence, dont la variabilité est supérieure. Cette technique se caractérise donc par un fort pouvoir discriminant. Elle semble donc particulièrement adaptée aux investigations épidémiologiques concernant une même espèce bactérienne. Le choix des gènes constitue la difficulté majeure dans le développement de cette technique. Ceux-ci doivent être en nombre réduit pour éviter que la mise en oeuvre de la technique ne devienne trop lourde. Ils doivent surtout permettre une discrimination pertinente des souches. Pour séparer les souches cliniques des souches environnementales, Gaia *et al.* proposent l'utilisation des gènes suivants : *mip* (macrophage infectivity potentiator), *mompS* (outer membrane protein), *flaA* (flagellum A), *pilE* (type IV pilin), *asd* (aspartate-beta-semialdehyde deshydrogenase) et *proA* (zinc metalloprotease) (50).

L'excellente reproductibilité de ces techniques basées sur le séquençage de l'ADN a permis de réaliser une banque de séquences (version 1.5), consultable sur le site www.ewgli.org (50). Chaque clone bactérien est caractérisé par une succession de numéros. Ce code correspond à un type, désigné par les initiales ST pour le terme anglais « Séquence Type ». Pour le lire, il faut tenir compte de chaque numéro et du rang de celui-ci dans la succession. Le rang de chaque numéro correspond à un gène donné. Ainsi, le premier rang renseigne sur le gène *flaA*, le deuxième rang sur le gène *pilE*, etc. Le numéro désigne un allèle de ce gène. Il est attribué selon l'ordre chronologique des descriptions alléliques dans la littérature. Ainsi, les allèles de la souche de référence, *Legionella pneumophila* Philadelphia portent tous le numéro 1, quel que soit le gène. Le ST de ce clone correspond donc à une série de 1 (51).

Cette nomenclature est évolutive car elle permet d'intégrer la description de nouveaux gènes. Chaque ST est alors rallongé d'un rang. D'après une telle banque de séquences, il est alors possible d'étudier les performances des différentes associations de gènes en vue d'optimiser la technique de SBT.

3. Pouvoir pathogène des légionelles

3.1. Facteurs de virulence chez *Legionella*

Les déterminants de la virulence des *Legionella* constituent un sujet de recherche très actuel, notamment parce que leur connaissance ouvrirait d'intéressantes perspectives prophylactiques. De nombreuses études ont été menées sur ce sujet en faisant appel à des approches différentes, d'abord biologiques, biochimiques puis génomiques.

Les mesures d'activité biologique globale ont mis en évidence la production bactérienne de plusieurs toxines (cytotoxines, cytolysine). Toutefois, ces méthodes ne permettent de détecter ni les injections ou sécrétions limitées à certaines organelles, ni les facteurs de virulence sans activité biologique propre.

L'approche biochimique est particulièrement adaptée à la recherche de déterminants enzymatiques. Les enzymes sont fréquemment support de virulence chez les bactéries. Une bonne connaissance de l'arsenal enzymatique d'un microorganisme donne les bases nécessaires à la compréhension de la pathogenèse de la maladie à laquelle il est relié.

L'étude du génome bactérien a finalement permis de détecter et tester de nouveaux facteurs de virulence. Les techniques utilisées sont celles de suppression génique, de mutations dirigées et de séquençage. Il est ainsi possible de mesurer l'impact phénotypique d'une synthèse protéique ou d'une mutation.

3.1.1. Toxines

La cytolysine RtxA est impliquée dans l'adhérence et la pénétration intracellulaire de la bactérie. Elle participe également à l'échappement microbien vers le milieu extracellulaire. En effet, RtxA permet la formation de pores transmembranaires qui provoquent la lyse de la cellule hôte (30).

Le lipopolysaccharide (LPS), constituant essentiel de la paroi de bacilles à Gram négatif porte une endotoxine. C'est un lipide complexe porteur d'un polysaccharide homopolymérique, constitué d'un résidu simple : l'acide légionaminique. Sur le plan immunologique, il constitue l'antigène O des bacilles à Gram négatif. Chez *Legionella*, le LPS a une expression variable selon les phases de croissance ou de survie bactérienne (86). Cette alternance phénotypique du LPS serait liée à l'insertion/excision d'un fragment génique instable de 30 kilobases, d'origine phagique probable (85).

3.1.2. Enzymes

L'enzyme Mip (Macrophage infectivity potentiator) est une protéine de surface de 24 kilodaltons. Elle possède une activité peptidyl-propyl-*cis/trans*-isomérase (44), indispensable à la survie intracellulaire des légionelles. Cette enzyme potentialise l'infection des protozoaires ou des macrophages humains (27; 44). La structure de cette enzyme a été déterminée par cristallisation. Elle correspond à un homodimère dont les deux domaines sont connectés par les parties N-terminales, organisées en longues hélices alpha. Le côté C-terminal supporte le site actif et montre une forte homologie avec l'enzyme Fkbp12 humaine, possédant la même activité (105; 76). Il semblerait que le fragment N-terminal et la dimérisation de la protéine soient plus impliqués dans la virulence que l'activité enzymatique elle-même (76).

Les mécanismes de défense de la bactérie contre les composés réactifs de l'oxygène sont impliqués dans la capacité du microorganisme à se répliquer au sein d'une cellule hôte. Kat A et B sont deux catalases, l'une périplasmique et l'autre cytosolique, respectivement. Elles assurent le maintien d'une concentration intracellulaire en H₂O₂ qui soit compatible avec la bonne évolution du phagosome de réplication (6). Plusieurs superoxyde dismutases sont également décrites (112; 115). Au total, ces enzymes du stress oxydant agissent pour la protection de la bactérie plutôt que pour la virulence de celle-ci.

3.1.3. Mobilité

Le flagelle est un élément lié à la virulence des légionelles car il favorise leur rencontre avec les cellules hôtes. Ainsi les mutants non flagellés sont moins infectieux que les types sauvages (34) ; mais la présence ou non d'un flagelle n'a pas d'impact sur la multiplication intracellulaire (90). Son expression est cycle-dépendante. Génétiquement, il est relié au phénotype de virulence. La régulation de son apparition ou disparition est actuellement à l'étude (67).

3.1.4. Adhérence

La protéine Momp (Major outer membrane protein) fixe les fractions C3 et C3bi du complément et intervient dans la reconnaissance des récepteurs CR1 et CR3 des macrophages par *Legionella* (9).

Les protéines de stress (Hsp) bactériennes sont produites en quantité abondante au cours d'une infection microbienne. Elles interviennent dans la maturation protéique et dans les systèmes de sécrétion. Elles sont, d'une manière générale, des cibles pour le système immunitaire de l'hôte infecté. Toutefois, leur participation à la pathogenèse au cours d'une infection est peu documentée. Dans le cas de *Legionella pneumophila*, la chaperonine est localisée en surface ou dans le périplasme, grâce aux systèmes de sécrétion. Certaines souches, dont les systèmes de sécrétion sont défectueux, sont incapables d'exprimer à leur surface la protéine Hsp60. Leur pouvoir infectieux vis-à-vis des cellules HeLa est alors diminué d'un facteur 1000 (69). Hsp60 favorise en effet la reconnaissance des cellules hôtes, mammifères ou protozoaires, et l'infection des cellules HeLa (lignée cellulaire issue d'un carcinome du col utérin). Elle agit indépendamment du complément. Cependant, ses récepteurs ne sont pas encore identifiés (52). Hsp60 intervient également de manière précoce dans l'inhibition de la fusion phagosome-lysosome.

La présence d'un pili de type IV sur la surface bactérienne est favorable à l'infection cellulaire. L'étude d'un mutant dont l'expression du pili de type IV est défectueuse montre une adhérence aux cellules épithéliales (HeLa, WI-26), aux macrophages (U937) et aux amibes (*Acanthamoeba polyphaga*) diminuée de 50%. Il garde par ailleurs un phénotype sauvage vis-à-vis de la multiplication intracellulaire (116).

3.1.5. Métabolisme du fer

Le fer est indispensable à la croissance de la grande majorité des bactéries. Il intervient dans la fonctionnalité de protéines majeures, les metallo-protéines à fer.

Chez *Legionella pneumophila*, dont la croissance est intracellulaire, le fer est impliqué dans les mécanismes d'infection de la cellule-hôte. Plusieurs systèmes de captation du fer ont été décrits.

FrgA (Fur regulated gene A) est un gène indispensable à la bonne répllication intracellulaire de la bactérie. Son expression est régulée par le taux de la protéine Fur, sensible à la concentration en fer du milieu. L'analyse nucléotidique de ce locus met en évidence des homologues avec une aérobactine synthétase appartenant à *Escherichia coli*. L'aérobactine est un capteur du fer environnemental. Il semblerait donc que *L. pneumophila* produise des sidérophores, c'est-à-dire des chélateurs du fer ferrique, nécessaires à sa répllication intracellulaire (68).

Liles *et al.* décrivent la production par *L. pneumophila* d'un sidérophore atypique dont la structure ne comprend ni hydroxamate, ni phénolate. C'est la légioabactine (81).

IraAB est un autre gène impliqué dans l'acquisition du fer, l'infection cellulaire et la virulence des légionelles. Il code pour IraA, une méthyltransférase dont la fonction est critique pour le maintien d'une virulence, et pour IraB, capteur de fer original puisqu'il fait intervenir des di- ou tri-peptides en tant que transporteurs (122).

3.1.6. Systèmes de sécrétion

La sécrétion de protéines est un procédé universel et fondamental de la physiologie microbienne, impliqué dans les phénomènes d'infection. De nombreux germes à Gram négatif exportent par exemple, leurs protéines de virulence à travers une à deux membranes jusqu'à leur site d'action pour pénétrer une cellule réceptrice. Les systèmes utilisés sont très variés selon les espèces bactériennes.

Chez *Legionella pneumophila*, deux systèmes de sécrétion majeurs ont été décrits. Ce sont les systèmes de type II Lsp, PilD dépendants, et de type IV codés par les gènes *dot/Icm* (defect in organelle trafficking/intracellular multiplication).

Les gènes supports du système de sécrétion de type II sont éparpillés sur cinq régions chromosomiques différentes. La fonction protéique est importante pour la croissance intracellulaire des bactéries ainsi que pour leur virulence (110). Elle consiste à

transporter de nombreuses enzymes vers l'extérieur : phosphatases, lipases, protéases, RNAses (45).

Le système de sécrétion de type IV est produit par 24 gènes, répartis en deux régions géniques et codant pour un ensemble de protéines transmembranaires (123). Celles-ci s'assemblent dans la membrane bactérienne et permettent le transport de plasmides et de facteurs de virulence. Ce système est, par exemple, utilisé par les inhibiteurs de la fusion phagosome-lysosome qui permettent à *Legionella* de reprogrammer l'évolution de la vacuole qui la contient (79). Trois protéines utilisant ce système de sécrétion ont été décrites à ce jour. DotA est impliquée dans la formation de pores dans les membranes eucaryotes de manière à permettre la circulation des effecteurs bactériens (97). LidA est une protéine transloquée dans la membrane du phagosome. Elle joue un double rôle de régulation de l'assemblage du système de sécrétion et probablement de recrutement des vésicules pour la formation de la vacuole de réplication (31). RalF est une protéine d'échange contre le facteur de ribosylation de l'ADP (ARF), protéine de la famille des GTPases. Elle permet ainsi la captation de l'ARF au sein du phagosome contenant les légionelles. La présence de ce facteur conditionne la fonctionnalité de l'organelle de réplication (96). Une fois que le phagosome, contenant les bactéries, fournit les conditions optimales de croissance, le système de sécrétion devient inutile. Au total, ce système permet la survie et la croissance de *Legionella* au sein des macrophages, préserve de l'acidification du phagosome et de la fusion lysosomale.

Certaines études ont déjà montré une corrélation entre la présence de plasmides et la virulence ainsi qu'une plus grande persistance dans l'environnement des souches possédant des plasmides (19; 12). Un plasmide portant un système de sécrétion de type IV impliqué dans la virulence, qui peut être présent à la fois sous forme excisée ou intégrée dans le chromosome, a été identifié dans les souches *Legionella pneumophila* Paris et Philadelphia. Dans d'autres souches, le même type d'élément instable est associé à la virulence : les souches perdent leur virulence lorsque le plasmide est excisé (85).

3.2. Régulation de la virulence

3.2.1. Température

La température est un facteur environnemental agissant sur la mobilité, l'adhérence et la virulence globale des légionelles. La production de flagelline est plus importante à 30°C qu'à 41°C (100; 66). Celle du pili IV est majorée à 30°C par rapport à 37°C (82). L'adhérence mesurée d'une manière plus globale est meilleure à 25°C en comparaison de celle obtenue à 41°C (37). Enfin, la virulence, mise en évidence par mesure des DL 50 (Dose Létale à 50%) sur modèle animal (cochon d'Inde), augmente lorsque l'on passe de 25°C à 37°C.

Les caractères de mobilité et d'adhérence sont favorisés dans des conditions de température inférieure à 37°C. Cette donnée souligne la forte adaptation de la bactérie à son environnement aquatique dont la température monte rarement au dessus de 30°C. Toute élévation de température représente un stress auquel *Legionella* répond par une augmentation de sa virulence.

3.2.2. Les phases de croissance

3.2.2.1. *Effet de la carence nutritive*

Après croissance sur phagocytes, on observe que *Legionella pneumophila* est plus résistante aux biocides et antibiotiques (7; 8), plus infectieuse vis-à-vis des cellules mammifères et plus virulente sur le modèle animal murin (29; 18; 28). Ce phénotype résulte de la carence nutritive intracellulaire (21; 60). La cellule hôte est un espace limité qui ne permet pas une multiplication infinie des légionelles. En présence d'un nombre croissant de bacilles, la qualité nutritive de la cellule baisse et provoque une diminution de la vitesse de croissance des microorganismes. Le passage en phase de croissance stationnaire s'accompagne de cette modification phénotypique qui va permettre l'échappement de la bactérie à un environnement défavorable. Le phénotype virulent, infectieux et résistant à des conditions environnementales difficiles, est donc exprimé sous l'influence de la qualité nutritive de l'environnement, en réponse à un besoin de survie de la bactérie.

3.2.2.2. *Le modèle de la réponse stringente*

La réponse stringente désigne un modèle qui décrit les mécanismes de transformation phénotypique de la bactérie au contact d'un environnement nutritif pauvre. Ce modèle est impliqué dans la stratégie de survie de nombreux microorganismes environnementaux. Le phénotype d'échappement adopté est variable selon les besoins de l'espèce concernée. Il doit être compatible avec le mode de vie de celle-ci.

Chez *Escherichia coli*, la réponse stringente agit sur la physiologie microbienne de manière à tolérer un environnement pauvre en nutriment (119).

Chez *Bacillus subtilis*, une carence nutritive induit en cascade l'accumulation de ppGpp, l'expression de protéines de stress et finalement une sporulation (125).

Chez *Legionella pneumophila*, ce système de transduction de signaux coordonne virulence et faible qualité nutritive de l'environnement (60). Pour une bactérie intracellulaire, la solution à une carence environnementale est le changement d'hôte. L'acquisition d'une virulence permet à *Legionella* de lyser sa cellule hôte pour évoluer vers une nouvelle.

Les interactions moléculaires supports de cette réponse adaptative ont d'abord été étudiées chez *Escherichia coli*.

Une carence nutritive environnementale engendre au sein du microorganisme une diminution de la concentration cytoplasmique d'acides aminés. Par lien de conséquence, celle des ARNs de transfert non chargés augmente. Puis en réponse à cette élévation, la production de l'enzyme RelA, responsable de la synthèse de l'alarmone ppGpp est accrue (14). Il en résulte une accumulation de ppGpp. Cette molécule signal est une guanosine doublement pyrophosphatée en 3' et 5' (figure 8).

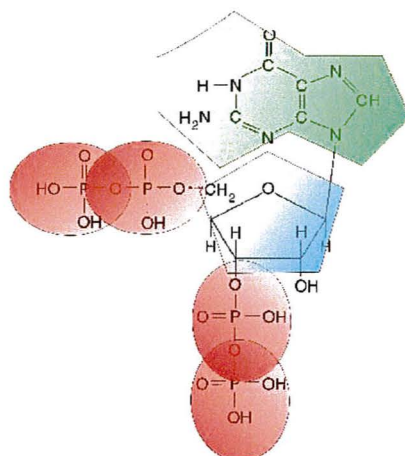


Figure 8 . Structure chimique de ppGpp.

Une seconde enzyme, SpoT, possède la double activité ppGpp-3'-pyrophosphohydrolase et synthase. Elle est productrice de ppGpp en réponse à un manque de fer ou de sources carbonées et possède également un rôle de dégradation de l'alarmone lorsque les conditions nutritives se normalisent (55; 121). En concentration importante, ppGpp permet le déplacement des facteurs sigma de la polymérase en faveur de RpoS, un facteur sigma alternatif (56; 70). Les facteurs sigma sont des régulateurs de l'expression génique qui assurent le lien entre polymérase et gène en reconnaissant les promoteurs. Cette reconnaissance est modulée selon les affinités facteur – promoteur. Dans le cas de RpoS, la transcription est en faveur des gènes de la phase stationnaire (64).

Ces trois gènes sont des régulateurs globaux (60; 5; 93). Ils agissent sur l'adaptation bactérienne et génèrent par leur variabilité une certaine diversité microbienne. Une étude d'évolution expérimentale a été menée chez *Escherichia coli* (32). Douze populations d'*E. coli* ont été entretenues à partir d'un ancêtre commun sur milieu glucosé pendant 20 000 générations. Le transcriptome de deux de ces populations a été comparé avec celui de leur ancêtre commun grâce à l'utilisation de puces à ADN complémentaire. Cinquante-neuf gènes montrent une variation significative de leur niveau d'expression. Ce sont vraisemblablement les gènes qui supportent les mécanismes d'adaptation de la bactérie à son environnement. Or, parmi eux figurent les gènes régulateurs du taux de ppGpp.

La même équipe montre également qu'une mutation non synonyme de *spoT* est le support d'un gain de compétitivité pour *E. coli*. En effet, si cette mutation est introduite chez l'ancêtre, celui-ci exprime certains caractères de la population fille et notamment sa meilleure compétitivité. Introduite chez une autre des populations filles, cette mutation n'apporte pas de bénéfices notables. Il semblerait donc qu'il y ait d'autres gènes dont la variabilité est susceptible d'apporter un gain de compétitivité.

Au total, cette étude souligne le rôle de la réponse stringente dans l'évolution bactérienne vers une meilleure adaptation à son environnement. Les gènes qui la supportent sont une cible préférentielle de la pression sélective exercée par le milieu. La variabilité qui en résulte est à l'origine de la diversité des phénotypes microbiens.

Ce système de transduction de signaux, tel qu'il est décrit chez *Escherichia coli* est utilisé par *Legionella*. Deux observations clef supportent cette hypothèse : d'une part, la bactérie accumule l'alarmone ppGpp en réponse à une carence nutritive ; d'autre part, le fait d'activer artificiellement l'expression de *relA*, en l'absence de toute carence nutritive, induit via ppGpp l'expression du phénotype de virulence (93).

L'étude de la réponse stringente chez *Legionella* a mis en évidence quelques particularités (figure 9). RelA est le principal producteur de ppGpp. Si le gène est muté de manière à le rendre non fonctionnel, le taux de ppGpp diminue nettement, sans compensation de la part de SpoT (126). RpoS coordonne l'expression des différents facteurs de virulence en réponse aux concentrations de ppGpp (5). Il agit en compétition vis-à-vis des autres facteurs sigma qu'il est capable de déplacer de leur liaison avec la polymérase lorsqu'il est exprimé en quantité importante. Ainsi, RpoS peut inhiber l'expression de trois traits dépendant du facteur sigma FliA chez des macrophages d'origine murine (5). RpoS conditionne la croissance intracellulaire chez *Acanthamoeba castellanii* (59). Les gènes *relA* et *rpoS* ne sont pas impliqués dans l'expression du système de sécrétion Dot/icm (126). Les traits régulés par la réponse stringente sont la présence d'un flagelle, la mobilité, l'évasion lysosomale, la cytotoxicité, la résistance au choc osmotique, à la chaleur, aux rayonnements UV et à la carence nutritive (93).

L'homologue de *spoT* a été identifié dans le génome de *Legionella pneumophila* à partir de celui d'*E. coli* (52% d'identité, 70% de similarité). Un mutant délété pour ce gène a été difficilement obtenu chez *E. coli* mais impossible à réaliser chez *L. pneumophila*. Il est vraisemblable que ce gène soit essentiel chez *L. pneumophila* (126).

Deux autres gènes ont ensuite été décrits : *letA/S* et *csrA*. CsrA est une protéine appartenant à une famille de régulateurs globaux (109). Elle induit le phénotype correspondant à la phase stationnaire en exerçant une répression post transcriptionnelle de l'expression des gènes de virulence. Son mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la traduction. CsrA se fixe sur certains ARN messagers, porteurs d'une séquence consensus voisine du site de fixation du ribosome. Cette liaison déstabilise le couple ribosome-ARNm et empêche la traduction de ce dernier (92). LetA/S est un système de régulation à deux composants. Il active l'expression génique de manière indirecte via certains répresseurs de la traduction dont CsrA. Ce binôme moléculaire induirait la synthèse d'un ARN régulateur *csrB*, capable d'empêcher la liaison de CsrA aux ARN messagers. LetA serait un inducteur fort de l'expression de *dotA* (87).

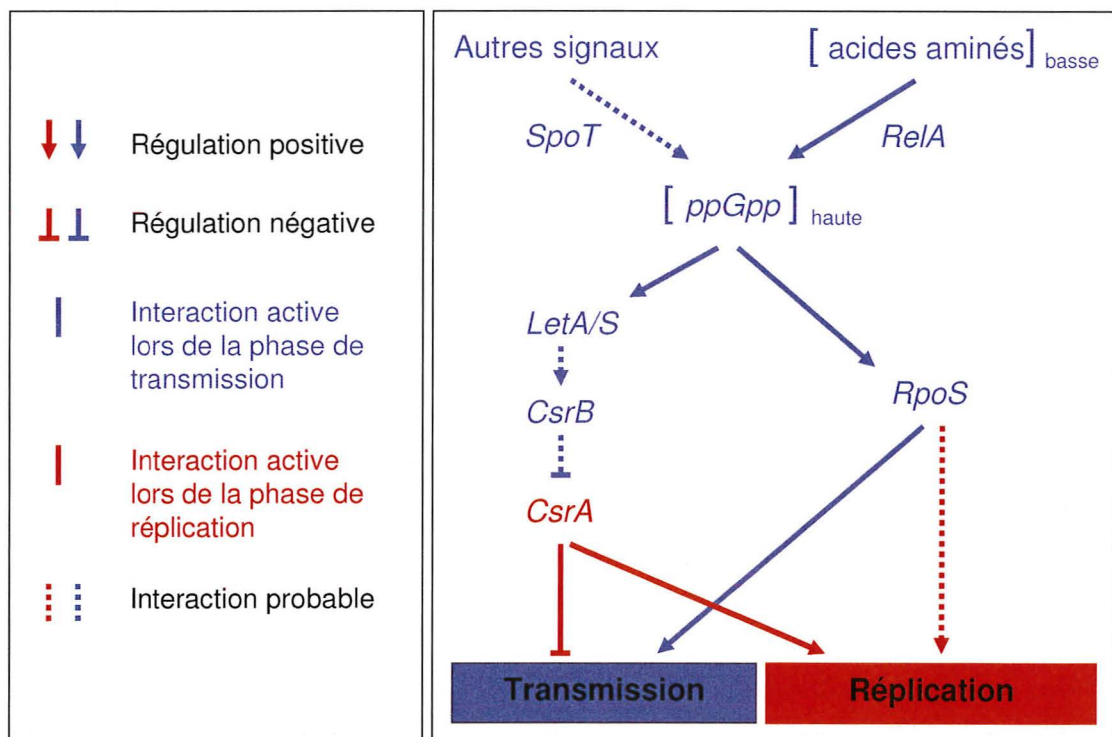


Figure 9 . Schéma de régulation des phénotypes propres à la transmission et à la réplication chez *Legionella pneumophila*.

En situation de carence nutritive, la faible concentration en acides aminés du milieu provoque l'augmentation du taux de ppGpp par l'intermédiaire de RelA. La participation de SpoT à la synthèse de ppGpp reste à investiguer. PpGpp induit une élévation des quantités intra-bactériennes de RpoS et de CsrB (par l'intermédiaire de *letA/S*). CsrA, favorable à l'expression du phénotype répliatif, voit son action inhibée par *csrB*, pendant que RpoS permet l'acquisition du phénotype de transmission. D'après Molofsky 2004 (93).

Travail personnel

1. Objectifs

Il existe une hétérogénéité d'expression du pouvoir pathogène chez *Legionella pneumophila* de séro groupe 1 en fonction de la souche considérée. Toutes les souches ne donnent pas de maladies et toutes les souches donnant des maladies n'ont pas le même profil épidémiologique (102; 104; 3). Au sein de ce séro groupe, la détermination d'un marqueur génétique de la virulence serait intéressante. Elle permettrait de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la virulence chez *L. pneumophila*. D'autre part, il serait possible de caractériser rapidement une souche virulente en faisant appel à la technique de SBT. Des applications seraient alors envisageables en prévention du risque épidémique lors d'une contamination d'un réseau d'eau par *L. pneumophila* 1 ou encore en thérapeutique dans le développement de nouvelles cibles thérapeutiques. Les gènes *mip*, *dotA* et *mompS*, codant pour des facteurs de virulence, ont déjà été testés comme marqueur de la pathogénicité des souches, sans succès (20; 4). Nous proposons alors l'étude de gènes régulateurs de la virulence. La réponse stringente est impliquée dans le processus de virulence de *L. pneumophila* et c'est une cible de la sélection naturelle. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que la variabilité des gènes impliqués dans ce mécanisme adaptatif peut être en lien avec les caractères bactériologiques (croissance intracellulaire) ou épidémiologiques (source, profil épidémiologique) des différentes souches. Pour tester cette hypothèse, nous allons :

- caractériser la variabilité des gènes *relA*, *rpoS* et *spoT* chez *L. pneumophila* 1 Philadelphia, Lens et Paris,
- évaluer le regroupement en clusters des souches ayant des similitudes de source (environnementale ou clinique) ou de profil épidémiologique sur la base du polymorphisme des séquences nucléotidiques de *relA* au sein d'une sélection de 17 souches,
- tester un modèle de co-culture macrophagique en vue de la caractérisation phénotypique des souches.

2. Matériels et méthodes

2.1. Etude de la variabilité des séquences des gènes *relA*, *spoT*, *rpoS* et *rpoA* chez *Legionella*

2.1.1. Souches bactériennes

Le travail que nous avons réalisé repose sur 17 souches différentes.

Tableau I. Souches de *Legionella* issues de la collection du Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Grenoble.

SIU : Soins Intensifs d'Urgence ; MIB2 : Médecine Infantile B2

Espèce-Sérogroupe-Notation			Date	Provenance		
<i>L. pneumophila</i>	5	Lp5	04/10/1995	Isolats cliniques	CHU Michallon	4 ^{ème} étage
<i>L. pneumophila</i>	6	Lp6	13/01/1998		Annecy	/
<i>L. pneumophila</i>	1	4	30/01/2004		CHU Michallon	SIU
<i>L. pneumophila</i>	1	5	27/08/2004		CHU Michallon	SIU
<i>L. pneumophila</i>	1	6	20/10/2004		CHU Michallon	SIU
<i>L. pneumophila</i>	1	7	03/11/2004		Voiron	/
<i>L. pneumophila</i>	1	8	10/11/1995		D.Villard	/
<i>L. pneumophila</i>	1	16	/		CNRL	/
<i>L. pneumophila</i>	1	9*	11/12/2003		Isolats environnementaux	CHU La Tronche
<i>L. pneumophila</i>	1	10*	15/06/2004	CH La Mure		/
<i>L. pneumophila</i>	1	11*	01/09/2004	CH St Egrève		Le cèdre
<i>L. pneumophila</i>	1	12*	26/02/2004	CHU Veurey		/
<i>L. pneumophila</i>	1	13*	11/03/2004	CHU Michallon		6 ^{ème} étage
<i>L. taurinensis</i>	/	Lt*	10/06/2004	CHU La Tronche		MIB2

Quatorze sont issues de la collection du Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Grenoble (Tableau 1). Nous avons sélectionné 11 souches de *Legionella pneumophila* de séro groupe 1 isolées entre décembre 2003 et novembre 2004, plus une, plus ancienne, datant de novembre 1995. Deux *Legionella pneumophila* non séro groupe 1 sont ajoutées au pool ainsi qu'une autre espèce de légionelle : *Legionella taurinensis*. Ces souches se répartissent en huit isolats cliniques et six isolats environnementaux. Pour les distinguer, les légionelles d'origine environnementale sont notées d'une étoile (*).

Ces 14 souches ont été choisies de manière à obtenir une certaine variété de provenance. Les souches susceptibles d'être reliées épidémiologiquement ont été exclues de notre sélection.

Les isolats environnementaux ont été prélevés sur des centres hospitaliers géographiquement distincts.

Cinq des cas cliniques sélectionnés (tous sauf 4, 8 et 16) correspondent à des infections communautaires. Pour chacun, le diagnostic de légionellose a été posé au plus tard le deuxième jour d'hospitalisation. Ces isolats sont donc d'origine extra-hospitalière et vraisemblablement différents de la sélection d'isolats environnementaux hospitaliers.

Pour les cas cliniques correspondants aux isolats 4 et 8, l'isolement bactériologique a été réalisé à J 15 et J 6, respectivement. Ces légionelloses sont donc potentiellement nosocomiales. Les patients ont transité par le même pavillon, Dominique Villard, mais les dates de séjours sont éloignées : 2004 et 1995 respectivement. Il est donc peu probable que ces souches soient identiques. Parmi les isolats environnementaux sélectionnés, aucun ne provient de cet établissement.

La souche correspondant au numéro 16 a été fournie par le Centre National de Référence des *Legionella* de Lyon. Elle possède le pulsotype Paris. Les souches 9 et 11 ont été typées à posteriori par le CNRL. Elles possèdent toutes les deux le pulsotype Paris.

La culture bactérienne se fait sur milieu BCYE pendant 48 heures à 37°C. Pour chacune des 14 souches, nous effectuons un contrôle d'espèce sur une colonie isolée par agglutination sur billes de latex sensibilisées (Oxoid Legionella Latex Kit®).

Trois autres souches, non cultivées, ont pu être intégrées dans ce travail. Ce sont trois isolats cliniques, de pulsotypes Philadelphia, Paris et Lens, entièrement séquencés par les équipes de Chien *et al.* (souche Philadelphia) et de Cazalet *et al.* (souche Paris et Lens) (24; 26). Leurs génomes sont publiés et disponibles par Internet à l'adresse suivante :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>

Les séquences des gènes étudiés sont extraites de cette base de données. La souche *Legionella pneumophila* Philadelphia, ATCC 33152, constitue notre souche de référence (26).

2.1.2. Gènes cibles

Nous étudions les gènes *relA*, *spoT*, *rpoS*, *mip*, *dotA*, *acn*, *asd* et *rpoB*.

Les gènes d'intérêts sont *relA*, *spoT*, *rpoS*. *RelA* et *spoT* codent pour les enzymes productrices de ppGpp, alarmone de la réponse stringente. *RpoS* est un facteur sigma, régulé par la concentration en ppGpp et favorable à l'expression du phénotype de transmission.

Pour pouvoir comparer les résultats obtenus avec des travaux antérieurs, les gènes *acn*, *asd*, *rpoB*, *dotA* et *mip* ont également été étudiés. Les gènes *acn*, *asd* et *rpoB* assurent des fonctions dites de ménage au sein de la cellule. *RpoB* code pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase (114). *Acn* et *asd* codent respectivement pour une aconitase et une aspartate-bêta-semialdéhyde dehydrogénase (89; 61). Les gènes *mip* et *dotA* codent pour des facteurs de virulence impliqués dans l'infection cellulaire, la survie et la réplication intracellulaire (38; 111).

Ces huit gènes seront comparés pour les trois pulsotypes Paris, Lens et Philadelphia. *RelA* sera séquencé chez 14 souches additionnelles en raison de son caractère discriminant supérieur aux autres sur le plan des mutations non synonymes.

2.1.3. Extraction de l'ADN total bactérien

Cette extraction se fait sur deux colonies isolées d'un diamètre moyen de 5 mm pour chaque souche bactérienne. Les légionelles sont manipulées sous hotte PSM (Poste de Sécurité Microbiologique). Nous utilisons le kit QIAamp DNA Mini Kit[®], commercialisé par Qiagen. Nous réalisons d'abord un culot bactérien pour le mettre en présence d'une

protéinase K une heure à température élevée (70°C). Cette enzyme lyse l'enveloppe bactérienne. Nous obtenons alors de l'ADN nu et des débris cellulaires en suspension. L'ADN est ensuite précipité par l'éthanol absolu, lavé sur filtre, re-solubilisé et conservé à -20°C.

2.1.4. Amplification enzymatique de *relA*

2.1.4.1. *Choix des amorces*

Le gène *relA* a une longueur de 2205 paires de bases. Il est amplifié par fragments de 600 paires de bases. Cette longueur correspond à la limite de séquençage (750 paires de bases). Les fragments se superposent sur une longueur de 70 bases à chaque extrémité, de façon à ce que le séquençage soit exhaustif. La totalité de la séquence est obtenue grâce à l'amplification de quatre fragments.

Pour chacun, un couple d'amorces a été choisi selon les critères suivants :

- Absence de sites polymorphes d'après l'alignement des séquences *Legionella pneumophila* Paris, Lens et Philadelphia.
- Longueur de 20 bases.
- Pourcentage de G et C compris entre 40 et 60%.
- Température de fusion (T_m) > 50°C (estimée par la formule $(A+T)*2 + (G+C)*4$).
- Ecart de T_m de 5°C maximum.
- Absence de formation d'épingle à cheveux.
- Pas de formation de dimères d'amorces possible.

Tableau II . Oligonucléotides (5'>3')

Fragments	Amorces sens	Amorces antisens
A1	CCT CAT ACA GCG CAT GTC GA	GGC TTC GGT TGC CAG CTG TT
A2	GTT GAT GAT GTG CGA GTT GT	CCA AAA CGT CTC TTA ACC AT
A3	TAG CAG AAA TGG GTG TGG CA	CCC TCA ATA CGA AGA TCA CT
A4	ACC TCC AGA TAC TTC AGA AC	CGT CTT ATT GAG CGA ACA CA

2.1.4.2. Réaction d'amplification

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est composée de 20 cycles, précédés d'une dénaturation de 3 minutes à 94°C. Un cycle est constitué de trois phases : une phase de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une phase d'hybridation à 50°C pendant 30 secondes puis une élongation à 60°C à raison d'une minute par kilobase (45 secondes dans notre cas). Une élongation finale est prévue sur 10 minutes.

La polymérisation est assurée par un mélange enzymatique commercialisé par Fermentas sous le nom High Fidelity PCR Enzyme Mix[®]. La *Taq* polymérase est associée à une *Pfu* DNA polymérase douée d'une activité 3'-5' exonucléase qui permet la correction extemporanée des erreurs d'incorporation nucléotidiques produite par la polymérase. La polymérisation ne génère alors que $5,2 \cdot 10^{-6}$ erreurs par nucléotide et par cycle, c'est-à-dire quatre fois moins qu'une *Taq* polymérase seule.

Chaque gène est amplifié en triplet.

Le mélange réactionnel contient, dans 50 μ L, 1 μ M d'amorces, 0,2 mM de désoxynucléosides triphosphate, environ 1 μ g d'ADN, 0,25 μ L de mix enzymatique et 5 μ L de tampon MgCl₂ 10X. Le volume final est ajusté avec de l'eau distillée.

Les produits PCR sont mis en évidence sur un gel d'agarose à 1,8%, révélé sous UV par bromure d'éthidium. La migration en parallèle d'une même quantité (5 μ L) du marqueur de poids moléculaire SmartLadder[®] (Eurogentec) permet de valider la pureté du produit, de vérifier sa longueur en paires de bases et de faire sa quantification en vue du séquençage. Les amplicons sont purifiés sur Montage PCR₉₆ Plates[®] (Millipore).

2.1.5. Séquençage de *relA*

2.1.5.1. Principe du séquençage

Chaque fragment génique va être ré amplifié avec de nouvelles conditions réactionnelles. On apporte ici des nucléotides doublement modifiés. Ils sont marqués par fluorescence et capables de stopper la polymérisation, grâce au retrait d'un hydroxyle sur leur cycle ribose. L'absence de ce résidu polaire empêche la formation du pont phosphodiester qui permet l'attachement des nucléotides entre eux. L'incorporation aléatoire de ces didésoxynucléotides permet d'obtenir des amplicons de toutes les longueurs au nucléotide près. L'attribution d'un fluorochrome de couleur différente à

chaque nucléotide A, T, C ou G permet d'identifier la base terminale de chaque fragment. Une électrophorèse capillaire sur gel de polyacrylamide sépare les produits de cette PCR modifiée en fonction de leur taille. Ils sont détectés et caractérisés en sortie de colonne grâce à la fluorescence du nucléotide terminal.

2.1.5.2. Mode opératoire

La réaction d'amplification se fait dans un volume de 20 μL avec 2 μL d'ADN, 3 μL de l'amorce sens ou antisens à 10 μM et 4 μL de CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit[®] (Beckman Coulter). La quantité d'ADN ajoutée sera supérieure si l'intensité de la bande obtenue sur gel d'agarose est plus faible que celle du marqueur de poids moléculaire. Le mélange réactionnel est soumis à 30 cycles de température selon l'alternance : 20 secondes à 94°C, 20 secondes à 50°C et 4 minutes à 60°C. Chaque fragment est amplifié dans les deux sens 3'-5' et 5'-3'. Les produits de séquence sont ensuite purifiés sur colonne de Sephadex (Sigma-Aldrich), re-suspendus dans le formamide pour linéariser les brins et injectés dans le capillaire. Les données obtenues par électrophorèse capillaire sont exploitées avec le logiciel CEQ 2000XL DNA Analysis System[®] (Beckman Coulter) version 4.3.9. Une séquence consensus est établie pour chaque triplet.

2.1.6. Analyse des séquences nucléotidiques de *relA*

2.1.6.1. Alignement des séquences nucléotidiques

L'alignement des séquences est réalisé via CLUSTALW (25).

Deux critères sont observés : le nombre de substitutions synonymes (S) et non synonymes (NS) portées par le gène. Seules les mutations NS peuvent engendrer un changement phénotypique et une seule est suffisante.

2.1.6.2. Calcul du ratio d_S/d_N

Le programme SNAP, disponible sur Internet <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/SNAP/> permet de calculer le ratio substitutions synonymes sur substitutions non synonymes (98).

Ce ratio évalue la contrainte sélective à laquelle est soumis le gène. Si sa valeur est supérieure à 1, les mutations synonymes sont favorisées vis-à-vis des mutations non

synonymes. Il y a donc une sélection négative des souches, c'est-à-dire l'élimination des souches porteuses d'une mutation non synonyme. Le gène est conservé. Plus la valeur du ratio est importante, plus le nombre de substitutions non synonymes acceptables est faible. Si le rapport est inférieur à 1, alors le gène subit une sélection positive, favorable au changement d'acides aminés (84).

2.1.6.3. *Phylogénétique*

L'enjeu de la phylogénétique est de reconstituer la généalogie d'un gène. Cet exercice est facile lorsque l'on connaît le processus mutationnel qui fait évoluer les séquences. Mais ce n'est pas souvent le cas. Il est donc nécessaire de modéliser ce processus en tenant compte de la probabilité de substitution pour un site et de la variabilité de cette probabilité sur une séquence.

La méthode du maximum de vraisemblance propose une approche probabiliste. Pour une topologie d'arbre donnée, il y a maximisation de la probabilité d'obtenir les séquences observées sous un modèle de substitution fixé.

Dans notre cas, il s'agit moins de réaliser une généalogie que de représenter graphiquement les différences et ressemblances de nos souches entre elles.

Nous utilisons CLUSTALW pour obtenir les données sous format PHYLIP. Celles-ci sont alors soumises au programme fastDNAMl, une version dérivée et optimisée du programme DNAML issu du package PHYLIP. Il est disponible en ligne sur Internet à l'adresse http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/clustalw_in.pl. L'arbre phylogénétique est obtenu sous forme parenthésée et peut alors être lu dans le logiciel d'édition des arbres phylogénétiques TRIEVIEW.

2.2. Culture de *Legionella pneumophila* 1 sur cellules THP-1

2.2.1. Souches bactériennes

Trois *Legionella pneumophila* 1 ont été testées. Ce sont les souches 16 et 12* ainsi qu'un isolat clinique de pulsotype Lens, fournie par le Centre National de Référence des *Legionella* de Lyon. Ce sont donc deux souches de provenance clinique et de pulsotypes connus d'une part et une souche non typée et d'origine environnementale d'autre part. Les

souches typées appartiennent à deux profils épidémiologiques différents : épidémique pour le pulsotype Lens et endémique pour le pulsotype Paris.

2.2.2. Cellules THP-1

Les cellules THP-1 sont des monocytes humains. Ils nous ont été fournis par J. L. Mege (Unité des Rickettsies, Marseille). Ils sont cultivés en suspension dans du RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medium (Invitrogen) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Cambrex), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen) et 10 mM HEPES (Cambrex) à 37°C et une atmosphère contenant 5% de CO₂.

La viabilité des cellules en culture est déterminée par la coloration au bleu de Trypan (Gobco). Elle est de 95%.

2.2.3. Infection des cellules THP-1 par *Legionella pneumophila* 1

Les monocytes sont répartis dans des plaques de 24 puits à une concentration de 10⁵ cellules /mL. Chaque puit contient 1 mL de suspension cellulaire. La différenciation en macrophages adhérents est provoquée par l'ajout de 16 nM de PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acétate). Après 24 heures de contact, celui-ci est éliminé par un double rinçage avec du RPMI supplémenté.

Les inoculums bactériens sont préparés à partir de culture de 48 heures sur gélose BCYE, suspendus dans du RPMI et ajustés à 0,5 Mac Farland soit environ 10⁷ UFC/mL. Le RPMI ne permet aucune croissance bactérienne (106).

Les macrophages sont infectés par 100 µL de chaque suspension bactérienne, diluée au dixième. Nous obtenons un ratio cellules/bactéries de 1/1. Cet ajout définit le temps H0. Les bactéries sont laissées au contact des macrophages pendant une heure pour permettre leur pénétration intracellulaire. Le tapis cellulaire est ensuite rincé délicatement avec du RPMI/10%SVF de façon à éliminer toute légionelle extracellulaire, non adhérente. Les plaques sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂.

Les cellules ainsi que le milieu de culture sont récoltés par grattage et aspiration de chaque puit pour les temps H1, H6, H22, H30, H46 et H53. Chaque temps est réalisé en triplet.

2.2.4. Quantification bactérienne

2.2.4.1. *Par la méthode des UFCs*

La numération bactérienne par la méthode des UFCs (Unité Formant Colonie) est réalisée pour les temps H1, H22, H46 et H53 afin de valider les résultats obtenus en PCR. Les cellules sont lysées par choc thermique en passant successivement la suspension récoltée à -80°C dans de la carboglace puis à 37°C en bain-marie, trois fois de suite. Pour chaque échantillon, une série de six dilutions successives au $1/10^{\text{ème}}$ est réalisée (10^{-1} à 10^{-6}). Cent microlitres sont ensemencés en nappe sur gélose BCYE. Les colonies sont ensuite numérées à J3 et J5.

2.2.4.2. *Par PCR en temps réel*

L'ADN des légionelles est extrait de la suspension cellulaire grâce au kit QIAamp DNA Mini Kit[®] (Qiagen) selon les consignes du fabricant. Un témoin d'extraction négatif est associé à chaque extraction. La PCR en temps réel (PCR-TR) réalisée est celle décrite par Wellinghausen *et al.* ciblant le gène *mip* (macrophage infectivity potentiator) (124).

Les amorces utilisées sont les suivantes :

Amorce sens Lp-mip-PT69 5'-GCA TTG GTG CCG ATT TGG-3'

Amorce anti sens Lp-mip-PT70 5'-G(CT)T TTG CCA TCA AAT CTT TCT GAA-3'

Le fragment amplifié est de 186 paires de bases. La détection des amplicons est assurée par deux sondes fluorescentes et interactives selon le système de FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfert) (figure 10).

Lpneu LC 5'-LC Red 640 CCA TTG CTT CCG GAT TAA CAT CTA TGC C-phosphate-3'

Lpneu FL 5'-CCA CTC ATA GCG TCT TGC ATG CCT TTA-fluorescéine-3'

A.



B.

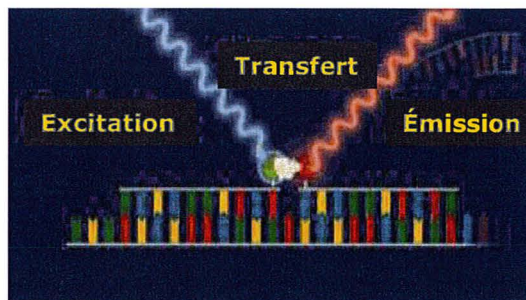


Figure 10 . Le système FRET.

Nous apportons sur l'échantillon une lumière dont la longueur d'onde, 490 nm, correspond à l'énergie d'excitation de la fluorescéine. **A.** En phase d'élongation, l'ADN est bicaténaire et les sondes sont libres. La fluorescéine, excitée, réémet immédiatement avec une longueur d'onde qui lui est propre (520 nm). **B.** En phase d'hybridation, les sondes sont fixes, sur l'ADN monocaténaire, les fluorochromes sont en vis-à-vis. Il y a alors successivement excitation de la fluorescéine, transfert de son énergie d'émission vers le LC Red 640, excitation du LC Red 640 et émission d'une fluorescence par ce dernier ($\lambda = 640$ nm). L'intensité de cette fluorescence est mesurée. Elle est proportionnelle à la quantité d'ADN monocaténaire en présence dans l'échantillon.

Le système FRET permet de suivre en temps réel l'évolution de la quantité d'ADN dans l'échantillon par le biais de la fluorescence. L'élévation de la fluorescence est d'autant plus précoce que la quantité initiale d'ADN est importante. Le temps T pour lequel la fluorescence franchit un seuil d'intensité donné correspond à une concentration initiale C d'ADN. Cette correspondance T/C est établit grâce à la préparation d'une gamme d'étalonnage.

Le mélange réactionnel est composé de 0,5 μ M de chaque amorce, 0,2 μ M de chaque sonde d'hybridation, 4 mM de $MgCl_2$, 2 μ L de Fast Start Master Hybridization Probes[®] (Roche Diagnostic), 4,6 μ L d'eau distillée et 5 μ L d'ADN extrait pour un volume final de 20 μ L.

L'ADN est dénaturé par chauffage à 95°C pendant 8 minutes puis amplifié via l'alternance de trois conditions réactionnelles pendant 45 cycles : dénaturation 10 secondes à 95°C, hybridation des amorces et sondes 10 secondes à 57°C et élongation 15 secondes à 72°C.

Un contrôle négatif est réalisé en remplaçant l'extrait d'ADN par de l'eau distillée certifiée sans ADN. Une gamme d'étalonnage et un contrôle positif sont établis à partir de l'ADN génomique de *Legionella pneumophila* Philadelphia ATCC 33152.

2.2.5. Statistiques

La comparaison des concentrations moyennes observées après 53 heures de culture sur cellules a été réalisée grâce au test de Student-Fischer, adapté au travail sur de petits échantillons. Il est admis que les échantillons sont répartis selon une loi normale et les variances sont supposées égales. Cette dernière hypothèse est vérifiée par le test de Snédécour pour les couples de souches 12/Paris et Lens/Paris.

On calcule alors sur l'ensemble des échantillons, une estimation unique s^2 de la variance commune σ^2 selon la formule suivante :

$$s^2 = \frac{\sum_i (x_i - m_A)^2 + \sum_j (x_j - m_B)^2}{n_A + n_B - 2}$$

m est la moyenne des concentrations observées à 53 heures de croissance et n le nombre de mesures faites de cette concentration. x désigne chaque mesure effectuée. Les couples d'indices A et i et B et j correspondent aux souches, qui sont comparées deux à deux.

La comparaison des moyennes pour chaque couple de souches s'appuie sur la valeur de t , définie telle que :

$$t = \frac{m_A - m_B}{\sqrt{\frac{s^2}{n_A} + \frac{s^2}{n_B}}}$$

Sa valeur seuil est lue dans la table de t pour un risque de 5%. La comparaison des deux méthodes de quantification, PCR et dénombrement des UFCs, est réalisée grâce au logiciel STATVIEW.

3. Résultats

3.1. Variabilité des gènes *relA*, *spoT*, *rpoS*, *acn*, *asd*, *rpoB*, *mip* et *dotA* au sein des souches *L. pneumophila* 1 Philadelphia, Paris et Lens.

A partir des génomes publiés des souches *L. pneumophila* 1 Philadelphia, Lens et Paris, nous avons réalisé l'alignement de trois gènes liés à la réponse stringente, *relA*, *spoT* et *rpoS*, de deux gènes codant pour des facteurs de virulence, *mip* et *dotA*, et de trois gènes, impliqués dans des fonctions dites de ménage, *rpoB*, *acn* et *asd*. La souche de référence est *L. pneumophila* 1 Philadelphia (tableau III).

Tableau III . Résultats de l'alignement des gènes *rpoB*, *acn*, *asd*, *mip*, *dotA*, *relA*, *rpoS* et *spoT* pour les trois souches *L. pneumophila* 1 Philadelphia, Lens et Paris.

Lp1 : *L. pneumophila* 1 ; SP : sites polymorphes ; S : mutations synonymes ; NS : mutations non synonymes ; ds/dn : ratio calculé selon la méthode Nei Gojobori (98).

Gène	Espèces testées	Souches testées	Longueur du gène	Allèles identifiés	SP	SP (%)	NS	ds/dn
<i>relA</i>	Lp1	3	2205	3	54	2,5	4	69,7
<i>spoT</i>	Lp1	3	2148	3	55	2,6	1	0,3
<i>rpoS</i>	Lp1	3	1026	3	24	2,3	4	12,8
	Lp1	3	162	/	/	/	/	1,9
	Lp1	3	879	/	/	/	/	43,7
<i>rpoB</i>	Lp1	3	4107	3	128	3,1	7	55,7
<i>asd</i>	Lp1	3	1023	3	23	2,2	2	25,9
<i>acn</i>	Lp1	3	2676	3	83	3,1	14	19,3
<i>mip</i>	Lp1	3	708	3	11	1,6	0	36,8
<i>dotA</i>	Lp1	3	3147	3	624	19,8	157	2,1

Les gènes d'intérêt, *relA*, *spoT* et *rpoS*, portent respectivement 54, 55 et 24 sites polymorphes. Chaque souche possède un allèle qui lui est propre pour les trois gènes. Leurs taux de mutation sont homogènes et compris entre 2,3% pour *rpoS* et 2,6% pour *spoT*. *RelA* et *rpoS* possèdent quatre mutations non silencieuses contre une pour *spoT*. Les mutations NS sont portées par les 200 premières bases pour le gène *rpoS*, alors qu'elles sont dispersées pour le gène *relA* (figure 11).

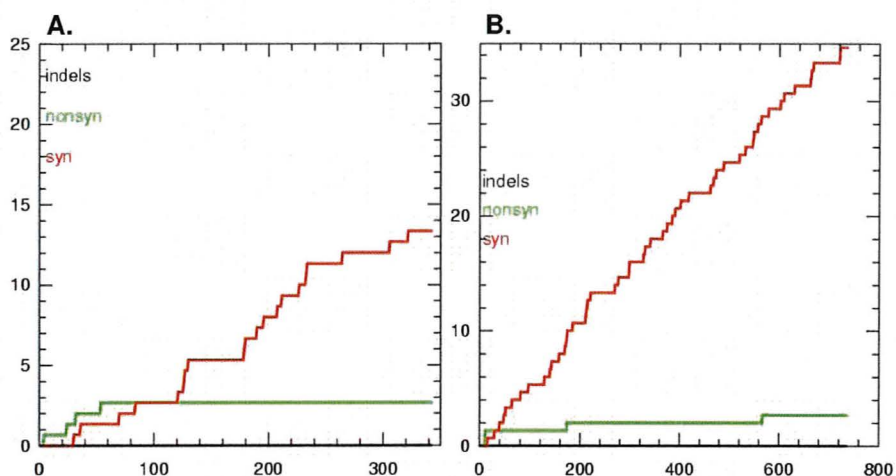


Figure 11 . Nombre de mutations cumulées synonymes et non synonymes codon par codon, pour les souches Lens, Paris et Philadelphia.

A : gène *rpoS* ; **B** : gène *relA*. En rouge, les mutations synonymes, en vert, les mutations non synonymes. Les gènes *spoT* et *rpoA* ne portent qu'une mutation non synonyme et ne sont donc pas représentés ici.

Pour le gène *relA*, les trois souches Lens, Paris et Philadelphia portent des mutations non synonymes qui leur sont propres (tableau IV). Les mutations touchant les codons 11 et 12 sont à la faveur d'un résidu hydrophobe. La substitution d'une proline par une alanine en 12 élimine un angle dans la chaîne polypeptidique. En 174, la réactivité des acides aminés inter-changés reste proche. Il y a toutefois une augmentation de l'encombrement stérique. En 567, une thréonine devient une alanine. Un constituant hydroxylé, hydrophile est donc remplacé par un acide aminé hydrophobe.

Pour le gène *rpoS*, les souches Lens et Paris possèdent les mêmes mutations non synonymes bien que les allèles soient différents. Les acides aminés 4, 24 et 32 sont substitués sans altération de la réactivité du site. C'est la longueur des chaînes latérales

qui est modifiée. En 54, la tyrosine, hydrophile, est changée contre une alanine, hydrophobe.

Pour le gène *spoT*, seule la souche Lens se distingue sur le plan des mutations non synonymes. Un acide aspartique est remplacé par une glycine au site 555. Il y a donc perte du caractère acide du résidu et diminution de l'encombrement stérique sur ce site.

Tableau IV . Description des substitutions d'acides aminés mises en évidence pour les gènes *relA*, *rpoS* et *spoT* lors de la comparaison des souches *L. pneumophila* 1 Lens et Paris à la souche de référence *L. pneumophila* 1 Philadelphia.

P : proline ; A : alanine ; V : valine ; I : isoleucine ; T : tyrosine ; M : méthionine ; D : acide aspartique ; E : acide glutamique ; G : glycine

	<i>relA</i>	<i>rpoS</i>	<i>spoT</i>
<i>L. pneumophila</i> 1 Lens	P 12 A V 174 I T 567 A	D 4 E E 24 D V 32 I	D 555 G
<i>L. pneumophila</i> 1 Paris	T 11 M	T 54 A	

Les gènes codant pour les facteurs de virulence *mip* et *dotA* portent respectivement 11 et 624 sites polymorphes (tableau III). Leurs taux de mutations sont très différents : 19,8% pour *dotA* et 1,6 pour *mip*. Nous dénombrons 164 mutations non synonymes chez *dotA* contre 0 pour *mip*.

Les gènes *acn*, *asd* et *rpoB*, impliqués dans des fonctions dites de ménage, portent respectivement 83, 23 et 128 sites polymorphes (tableau III). Ils ont un taux de mutations homogènes compris entre 3,1 pour *acn* et *rpoB* et 2,2 pour *asd*. Nous dénombrons 2, 7 et 14 mutations non synonymes pour *asd*, *rpoB* et *acn* respectivement.

Le rapport ds/dn informe sur la nature de la pression de sélection subie par les gènes (tableau III). Parmi les quatre gènes de la réponse stringente et pour les 3 souches étudiées, *rpoS* apparaît comme le moins conservé avec un ratio à 12,8. Si le calcul est réalisé séparément sur les 200 premières bases de *rpoS* d'une part puis sur la partie restante d'autre part, nous observons que ce gène est composé d'une zone soumise à une sélection

négative des mutations et une autre pour laquelle il n'existe pas de fortes contraintes. *SpoT* présente des contraintes protéiques vraisemblablement importantes et ne tolère qu'un faible nombre de substitutions non synonymes. Son ratio ds/dn est de 143,9. *RelA* subit une pression sélective négative d'intensité intermédiaire (ds/dn = 69,7). Les gènes *mip* et *dotA* ont respectivement un ratio de 36,8 et 2,1. Les gènes dits de ménage se caractérisent par un ratio intermédiaire, moins élevé que *spoT* mais plus fort que *dotA*. Leur polymorphisme est donc à rapprocher de celui des gènes *relA*, *rpoS* et *mip*.

3.2. Distribution allélique du gène *relA* au sein d'une sélection de 17 souches de *Legionella*.

Aucune zone de mutation préférentielle n'est mise en évidence par l'alignement des souches Paris, Lens et Philadelphia. Nous nous intéressons donc à la totalité du gène.

Nous dénombrons 83 sites polymorphes et huit allèles différents pour les 17 souches testées (Tableau V). La séquence de la souche de référence, *L. pneumophila* 1 Philadelphia, constitue l'allèle A. Les allèles de A, B, C et G sont représentés par une souche unique (*L. pneumophila* 1 Philadelphia, *L. pneumophila* 5, *L. pneumophila* 1 Lens et l'isolat 10*, respectivement). L'allèle D regroupe les souches 8 et 13*. L'allèle F comprend *L. taurinensis* et *L. pneumophila* 6. L'allèle E est le plus représenté, avec les 5 souches 4, 5, 6, 7 et 12*. La souche Paris et les isolats 9*, 11* et 16 portent l'allèle H.

Une seule mutation non synonyme supplémentaire est décrite. Elle touche le site 2077, soit le codon 692. Une glutamine est incorporée à la place d'une histidine. Il y a donc perte du caractère basique et du cycle imidazolé. Les allèles A, B et E ne possèdent aucune mutation NS. L'allèle H porte une seule mutation, NS en 32. Les allèles F et G possèdent 2 mutations NS en 32 et 2077. Enfin, les mutations NS 34, 520 et 1699 sont spécifiques de l'allèle C, soit *L. pneumophila* Lens.

Le taux de mutation du gène est alors de 3,8%. Le ratio ds/dn augmente de 69,7 à 85,9.

Nous observons que les allèles F, G et H sont très proches. Les allèles F et H sont identiques jusqu'à 1022 paires de bases. L'allèle G diffère alors d'une seule mutation. Les trois sont porteurs de la mutation NS 32. Aux bases 1023 et 1188, l'allèle G est superposable à l'allèle H. C'est l'allèle F qui se différencie. Les trois allèles sont ensuite

identiques de la base 1189 à la 1889. De 1890 à 2104, les allèles F et G sont similaires mais H varie. Cette structure en mosaïque évoque une certaine mobilité génique pour les souches appartenant à ces trois allèles (Paris, 9*, 11*, 16, 10*, *L. pneumophila* 6. et *L. taurinensis*)

Les souches *L. pneumophila* 6 et *L. taurinensis* possèdent la même séquence allélique, F. *RelA* ne permet donc pas de faire une distinction d'espèce.

La distribution des allèles de *relA* ne permet pas de différencier les souches environnementales des souches cliniques. Sur les huit allèles identifiés, quatre regroupent les deux types d'isolats. L'allèle D est présent chez la souche 13* isolée en milieu hydrique et la souche 8 isolée chez un patient. L'allèle E rassemble quatre souches cliniques (4 à 7) et la souche environnementale 12*. L'allèle H comprend les deux souches endémiques Paris et les souches 9* et 11*. Enfin, l'allèle F réunit *L. taurinensis** et une *L. pneumophila* 6 isolée chez un patient. Les quatre autres allèles sont représentés par une seule souche. Trois sont portés par des isolats cliniques (A : *L. pneumophila* 1 Philadelphia ; B : *L. pneumophila* 5 ; C : *L. pneumophila* 1 Lens).

Chaque pulsotype possède un allèle qui lui est propre. Les souches 9* et 11* ont été typées à posteriori. Ce sont des pulsotypes Paris.

Notre sélection de souches nous permet de distinguer deux profils épidémiologiques différents. Les quatre souches endémiques Paris portent l'allèle H. Les souches Philadelphia et Lens, épidémiques, ont des allèles différents A et C. *RelA* ne permet pas de regrouper les souches épidémiques au sein d'un même allèle.

Nous pouvons étudier la relation de ces deux allèles grâce à la réalisation d'un arbre phylogénétique (Figure 12). Tous les allèles sont représentés. Les allèles composites F, G et H sont réunis sur une extrémité. Cela concorde avec leur structure génique, décrite ci-dessus. Les allèles B et C semblent également liés. Les autres allèles sont en revanche très dispersés. Ainsi, les deux allèles A et C des souches épidémiques Philadelphia et Lens sont éloignés et on peut conclure que *relA* ne permet pas de relier ces deux souches de même profil épidémiologique.

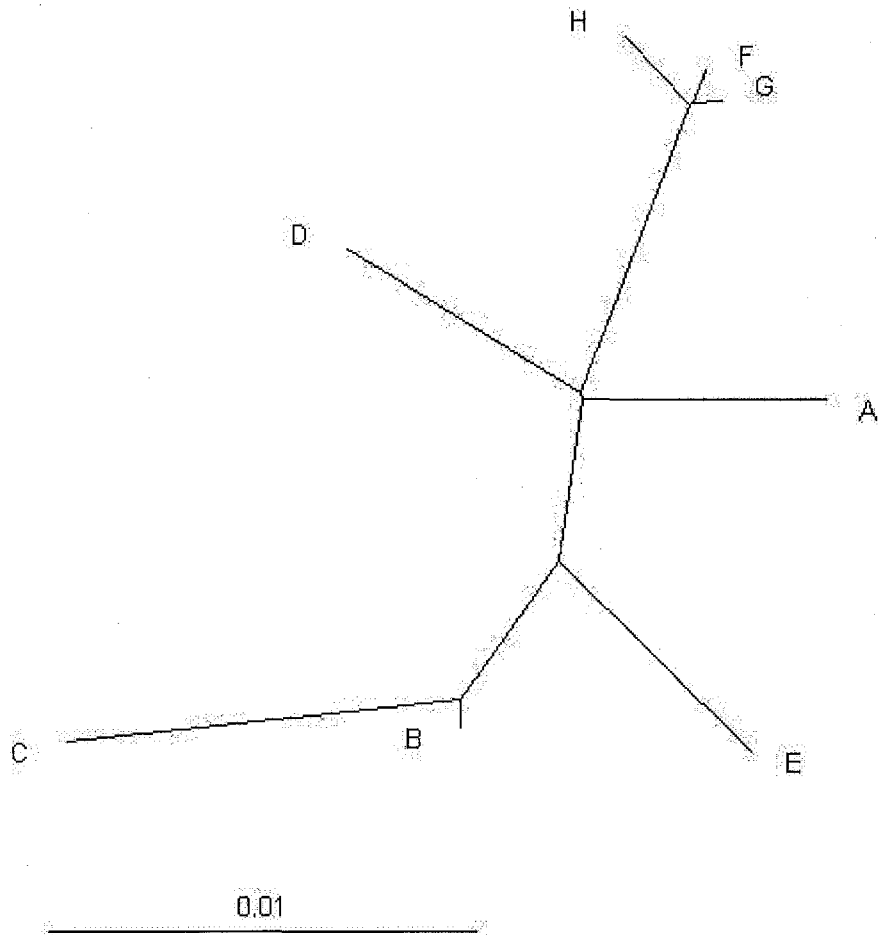


Figure 12. Arbre phylogénétique construit par la méthode du maximum de vraisemblance à partir des séquences des huit allèles décrits pour *relA*.

Les lettres majuscules correspondent aux allèles.

Allèle A : souche *L. pneumophila* 1 Philadelphia

Allèle B : souche *L. pneumophila* sérogroupe 5

Allèle C : souche *L. pneumophila* 1 Lens

Allèle D : souches *L. pneumophila* 1 8 et 13*

Allèle E : souches *L. pneumophila* 1 4 à 7 et 12*

Allèle F : souches *L. pneumophila* 6 et *L. taurinensis*

Allèle G : souche *L. pneumophila* 1 10*

Allèle H : souches *L. pneumophila* 1 Paris, 9*, 11* et 16

3.3. Comparaison des souches *Legionella pneumophila* 1 Lens, Paris et 12* sur co-culture macrophagique

La cinétique de croissance des trois souches Lens, Paris et 12* est réalisée grâce à la PCR quantitative en temps réel. Les données obtenues sont représentées par le graphe ci-dessous (figure 13) et reportées en annexe 1.

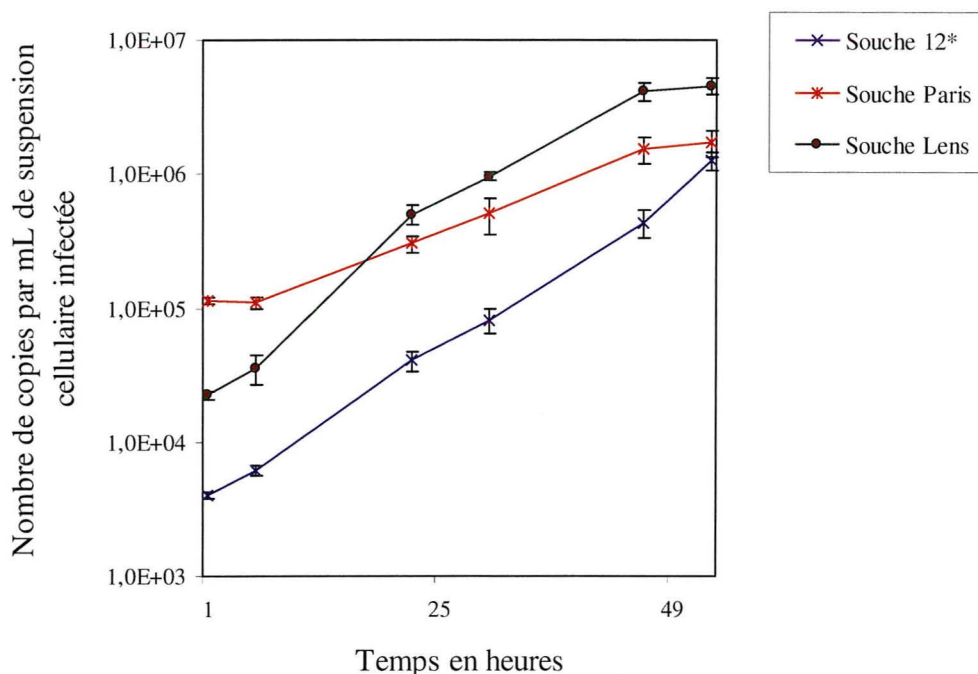


Figure 13 . Cinétique de croissance des trois souches *L. pneumophila* 1 Lens, Paris et 12* sur co-culture macrophagique de type THP-1.

Les bactéries en présence ont été quantifiées aux heures H1, H6, H22, H30, H46 et H53 par PCR en temps réel.

Les souches Lens et 12* ont une cinétique parallèle. Leur charge bactérienne diffère d'un log d'une manière quasi constante, en faveur de la souche Lens. La souche Paris a une croissance plus douce et rejoint la souche 12* à H53.

Tableau VI. Comparaison des inoculums, de la pénétration intracellulaire, de la croissance et de la concentration bactérienne finale des trois souches *L. pneumophila* 1 Lens, Paris et 12* en co-culture macrophagique de type THP-1.

	12*	Paris	Lens
Inoculum bactérien en copies par mL	3,36E+06	7,02E+06	5,20E+06
Pourcentage de bactéries adhérentes ou intracellulaires à 1 h	0,1%	1,6%	0,4%
Croissance bactérienne	313	15	203
Concentration bactérienne à H53	1,26E+06	1,96E+06	4,56E+06

Les inoculums des trois souches sont du même ordre de grandeur (tableau VI).

L'adhérence et la pénétration bactérienne à 1 heure sont meilleures pour la souche Paris que pour les souches Lens et 12*. Le pourcentage de bactéries capables au moins d'adhérer est de 1,6% pour la souche Paris contre 0,1 et 0,4% pour les souches Lens et 12*.

En point final, les concentrations bactériennes obtenues à H53 sont du même ordre de grandeur pour les souches Paris et 12* : $1,72 \cdot 10^6$ et $1,26 \cdot 10^6$ respectivement. La concentration de la souche Lens est significativement supérieure avec une valeur de $4,56 \cdot 10^6$ copies par mL ($t = 5,4$; $\alpha = 5\%$; ddl = 4).

La croissance bactérienne est faible pour la souche Paris. La concentration initiale est multipliée par un facteur 15 au temps H53. Pour les souches Lens et 12*, le facteur multiplicatif est de 203 et 313, soit du même ordre de grandeur. Leur croissance est par contre nettement supérieure à celle de Paris.

Pour valider l'utilisation de la PCR-TR en temps que technique de quantification, les points H1, H30, H46 et H53 ont été contrôlés avec la technique de référence, le dénombrement des UFCs (Annexe 2). On observe un log d'écart entre les déterminations de la charge bactérienne par PCR ou méthode des UFCs. La corrélation des points est testée grâce au logiciel STATVIEW (Annexe 3). La qualité de cette corrélation est donnée par le coefficient R^2 . Elle sera d'autant meilleure qu'il sera proche de 1.

Les valeurs de R^2 sont comprises entre 0,86 (Lens) et 0,97 (Paris). Elles confirment que la PCR en temps réel donne des résultats concordants avec la technique de référence qui est le dénombrement des UFCs et valident son utilisation dans cette étude.

Discussion

Le séro groupe 1 de *Legionella pneumophila* est responsable de 96% de légionelloses (35). Toutefois, certaines *L. pneumophila* 1, largement répandues dans l'environnement, ne provoquent que rarement des légionelloses (104). D'autres souches sont épidémiques (102). Le séro groupe 1 est donc hétérogène sur le plan du pouvoir pathogène. Les différences de virulence qui existent entre souches ont vraisemblablement un support génétique. L'évolution du pouvoir pathogène peut par exemple, correspondre à l'acquisition de nouveaux gènes ou à la perte ou la modification de gènes préexistants (113). Les génomes obtenus pour de nouvelles souches, *L. pneumophila* Lens et Paris, permettent d'investiguer sur la variabilité significative de certains gènes (24). Ces légionelles présentent une certaine mobilité génétique, médiée par deux plasmides, et 13% de polymorphisme. Ces différences génomiques concordent avec une divergence de profil épidémiologique : la souche Lens est épidémique, la souche Paris, endémique. Dans ce contexte, il est intéressant de chercher à établir une corrélation entre variabilité génétique et variabilité phénotypique.

Deux études ont déjà testé le caractère discriminant du polymorphisme de certains gènes vis-à-vis de la virulence. La première date de 2002 et porte sur les gènes *dotA* et *mip* (20). Ces deux gènes sont impliqués dans l'infectivité, la multiplication et la survie intracellulaire de *L. pneumophila*. Le séquençage de ces deux gènes est appliqué à 17 souches, de source environnementale ou clinique, recouvrant les sérogroupe 1 à 14. Les isolats d'origine clinique sont assimilés à des souches virulentes. *DotA* montre une variabilité quatre fois supérieure à celle de *mip*. Les clusters déterminés par étude phylogénétique d'après les séquences des deux gènes, ne correspondent ni aux sérogroupe, ni à la source clinique ou environnementale de la souche. La deuxième étude à été publiée en janvier 2005 (4). Elle est réalisée sur un pool de 175 souches *Legionella pneumophila* 1. La technique utilisée est le SBT. Trois gènes « ménage », *acn*, *asd* et *rpoB*, codant respectivement pour une aconitase, l'aspartate-béta-semialdéhyde deshydrogénase et la sous unité béta de l'ARN polymérase, et deux gènes, *mip* et *mompS*, impliqués dans la virulence, sont séquencés. Le pool de souches comprend 150 isolats cliniques et 25 environnementaux. Les souches cliniques sont caractérisées sur le plan épidémiologique comme étant épidémiques, endémiques ou sporadiques. La virulence des souches est appréciée par les critères de source et de profil épidémiologique des isolats.

Il ressort de cette étude que le polymorphisme des gènes choisis ne permet pas de séparer les souches sur les deux critères retenus.

Les résultats obtenus en SBT sont directement dépendants du choix des gènes. En effet, cette technique donne une information, non plus globale comme la technique de PFGE, mais précise et limitée. Les mécanismes de virulence chez *L. pneumophila* sont de mieux en mieux décrits et il apparaît que la pathogénicité d'une souche est complexe et plurifactorielle (119). Il est donc intéressant d'étudier les gènes régulateurs de cette virulence.

Les gènes de la réponse stringente, *relA*, *rpoS* et *spoT*, sont impliqués dans l'adaptation de la bactérie à son environnement. Régulateurs globaux, ils sont la cible préférentielle de la sélection naturelle. Leur effet pléiotrope fait qu'une faible variation de séquence peut engendrer des changements phénotypiques importants. Ce sont des générateurs de diversité microbienne. Ils participent ainsi à l'amélioration de la performance des bactéries au cours de l'évolution (32). Chez *L. pneumophila*, la réponse stringente régule l'expression du phénotype de virulence (60; 5). Les gènes qui y participent sont donc des candidats intéressants pour séparer les souches sur des critères de virulence par la technique du SBT.

Les gènes *relA*, *spoT*, *rpoS*, *mip*, *dotA*, *asd*, *acn* et *rpoB* sont alignés pour les souches Philadelphia, Lens et Paris. Pour caractériser le polymorphisme des gènes impliqués dans la réponse stringente, nous nous sommes intéressés au ratio ds/dn, à la distribution des mutations non synonymes, à celle des allèles et aux structures géniques observées.

Le ratio ds/dn, introduit par Nei et Gojobori, permet de définir si les mutations présentes sont la résultante d'une sélection ou bien de la dérive génétique (84). Il renseigne également sur la nature de la sélection, positive ou négative. Une sélection négative correspond à l'élimination de toute souche porteuse de mutations NS. C'est le cas lorsqu'il existe une forte contrainte protéique. La séquence peptidique ne peut pas être modifiée sans que la fonction associée soit altérée. Or il est peu probable qu'une mutation se fixe dans une population lorsqu'elle a des effets délétères. Inversement, la sélection est positive si une mutation NS favorise les individus qui la présentent. Dans ce cas, la probabilité qu'elle se fixe dans une population est importante (84). L'alignement de *dotA*, *mip*, *acn*, *asd* et *rpoB* nous permet de comparer nos résultats à ceux déjà publiés (tableau VII). Nous

observons qu'il y a autant de variabilité entre les souches *L. pneumophila* Lens, Paris et Philadelphia que dans une population de plus de 10 souches pour les gènes *acn*, *relA*, *dotA* et *mip* (20; 4). Ce n'est pas vrai pour *rpoB* et *asd* (4). L'augmentation du nombre de séquences comparées permet d'observer un plus grand polymorphisme.

Tableau VII . Revue bibliographique des données disponibles sur les gènes séquencés à ce jour chez *L. pneumophila*. (20; 73; 4; 50).

Lp : *L. pneumophila* ; maj : majoritaire ; S1 : côté 5' du gène *rpoS* ; S2 : côté 3' du gène *rpoS*.

Gènes	Espèces testées	Nombre de souches testées	Longueur du gène	Nombre d'allèles	Nombre de sites polymorphes (SP)	Pourcentage de mutations	Nombre de mutations (NS)	Ratio Nei Gojobori ds/dn	Références
<i>mip</i>	Lp1 à 14	17	233					39,5	Bumbaugh 2002
<i>mip</i>	Lp1 à 14	5	233					58,0	Bumbaugh 2002
<i>mip</i>	Lp1	3	708	3	11	1,6	0	36,8	Notre étude
<i>mip</i>	Lp1 maj	105	402	13	12	3,0			Gaia 2005
<i>mip</i>	Lp1	179	402	15	14	3,5	3	NA	Aurell 2005
<i>dotA</i>	Lp1 à 15	15	2949		645	21,9		9,7	Ko 2003
<i>dotA</i>	Lp1 à 14	5	1063					8,5	Bumbaugh 2002
<i>dotA</i>	Lp1	3	3147	3	624	19,8	157	2,1	Notre étude
<i>asd</i>	Lp1	179	473	15	19	4,0	3	1,3	Aurell 2005
<i>asd</i>	Lp1	3	1023	3	23	2,2	2	25,9	Notre étude
<i>asd</i>	Lp1 maj	105	473	13	35	7,4			Gaia 2005
<i>acn</i>	Lp1	179	427	17	22	5,2	6	18,8	Aurell 2005
<i>acn</i>	Lp1	3	2676	3	83	3,1	14	19,3	Notre étude
<i>rpoB</i>	Lp1	179	419	14	26	6,2	8	1,4	Aurell 2005
<i>rpoB</i>	Lp1	3	4107	3	128	3,1	7	55,7	Notre étude
<i>relA</i>	Lp1 maj	17	2205	8	83	3,8	5	85,9	Notre étude
<i>relA</i>	Lp1	3	2205	3	54	2,5	4	69,7	Notre étude
<i>spoT</i>	Lp1	3	2148	3	55	2,6	1	143,9	Notre étude
<i>rpoS</i> global	Lp1	3	1026	3	24	2,3	4	12,8	Notre étude
S1	Lp1	3	162					1,9	Notre étude
S2	Lp1	3	879					43,7	Notre étude

Parmi les trois gènes de la réponse stringente, le gène le moins contraint correspond au facteur sigma, *rpoS* ($ds/dn = 12,8$). Il subit une sélection négative de faible intensité. La concentration des mutations non synonymes en début de gène permet de définir deux zones distinctes. La première, constituée des 162 premières bases, possède un ratio ds/dn de 1,9. Cela traduit pour cette portion de gène une quasi absence de sélection des mutations NS. Ce faible niveau de contrainte se retrouve chez d'autres gènes. Aurell *et al.* montrent que les gènes « ménage » *rpoB* et *asd* présentent des ratios ds/dn de 1,42 et 1,29 respectivement (4). La partie S1 de *rpoS* subirait donc une pression de sélection analogue à celle qui s'applique aux gènes « ménage », assimilée à une simple dérive génétique (ds/dn proche de 1). Le fragment S1 correspond à la partie N-terminale de la protéine. Chez *L. pneumophila*, la fonction de cette protéine n'est pas connue. Chez *E. coli*, elle est impliquée dans la dégradation de RpoS (118). Toutefois, il est montré que ce fragment n'est pas essentiel à la fonction protéique du facteur sigma *in vivo* (103). La deuxième partie de *rpoS*, notée S2, présente un polymorphisme bien moins important. Son ratio ds/dn est de 43,7 signe un phénomène de sélection négative en faveur de la conservation de la séquence.

SpoT possède un ratio ds/dn très élevé. Il y existe donc une forte contrainte protéique, défavorable à toute variabilité. Cette observation fait écho aux travaux de Zusman *et al.* : les échecs répétés de la construction d'un mutant *L. pneumophila* délété pour *spoT* désignent ce gène comme étant un gène essentiel au bon fonctionnement cellulaire (126). *RelA* montre une variabilité intermédiaire ($ds/dn = 69,7$). Les observations faites ici sur la variabilité des gènes de la réponse stringente sont tout à fait compatibles avec celles rapportées lors des études d'évolution expérimentale chez *E. coli*. Les gènes impliqués dans la réponse stringente sont l'objet d'une pression de sélection importante lors de l'évolution adaptative. On retrouve ici des ratios ds/dn élevés pour les trois gènes. Toute mutation NS dont l'effet est délétère est éliminée ($ds/dn > 1$). Celles qui ont été conservées sont donc neutres ou bénéfiques. Chez *E. coli*, il a été montré que *spoT* est le support d'une mutation bénéfique acquise au cours de l'évolution (32).

La distribution des mutations non synonymes des gènes *relA*, *rpoS* et *spoT* entre les trois souches Lens, Paris et Philadelphia est décrite par le tableau IV. Nous observons qu'il est possible de différencier ces légionelles par leur profil de mutations non synonymes chez *relA*. Chaque isolat possède une séquence peptidique qui lui est propre. Cette

diversité signe l'évolution divergente des trois souches. L'arbre phylogénétique permet de la visualiser. Il faut également souligner l'originalité de la souche Lens qui porte, de manière spécifique, trois des cinq mutations non silencieuses décrites pour *relA* et 17 isolats.

Les similitudes de séquences de *relA* pour les allèles F, G et H avec une structure en mosaïque montrent que la recombinaison joue un rôle dans la genèse de nouveaux allèles chez *L. pneumophila*. Ce phénomène est également décrit sur les gènes *dot/icm*, impliqués dans les systèmes de sécrétion bactérienne (74).

Le gène *relA* est un gène pléiotrope, mutés chez les souches Lens et Paris et soumis à une sélection négative des mutations. Nous l'avons séquencé sur une sélection de 14 isolats pour tester son pouvoir discriminant vis-à-vis de la virulence. Dans un premier temps, nous avons choisi la source et le profil épidémiologique des souches comme critères de virulence. La comparaison des séquences obtenues permet de définir huit allèles. La distribution allélique ne respecte ni l'espèce ni le sérotype (20; 75). Elle ne permet pas de séparer les souches selon la source de leur isolement : clinique ou environnementale. Vis-à-vis des profils épidémiologiques, nous observons que les souches épidémiques portent des allèles différents. L'étude de leur relation phylogénétique montre qu'ils n'appartiennent pas non plus à un même cluster. Dans ce cas, nous pouvons conclure que *relA* ne permet pas de regrouper deux souches épidémiques au sein d'un même allèle et n'est donc pas marqueur du profil épidémiologique des souches. Nous observons cependant une parfaite corrélation des allèles avec le typage par électrophorèse en champ pulsé. Toutes les souches possédant l'allèle H se sont révélées être du type Paris en électrophorèse en champ pulsé.

Parallèlement à ce travail, nous avons tenté de développer un modèle de co-culture sur macrophages dérivés de cellules THP-1. L'objectif est de caractériser les souches étudiées par leur phénotype *in vitro* et d'obtenir un troisième critère de virulence, non lié à l'épidémiologie (113). En effet, les deux critères de virulence testés ci-dessus présentent certaines limites. La source d'isolement d'une souche n'est pas exactement représentative de sa pathogénicité. *Legionella* n'étant pas transmissible de personne à personne, les souches virulentes se trouvent dans l'eau avant d'infecter l'homme. Le pool des souches

environnementales peut donc contenir des souches virulentes. Par ailleurs, le déclenchement d'une légionellose chez un patient est la somme de différents facteurs : l'importance de l'aérosolisation du bacille, la sensibilité de la personne exposée et la virulence de la légionelle. Par conséquent, une souche peu virulente mais largement diffusée sous forme d'aérosols sur une population sensible pourrait provoquer une épidémie. Sous cet aspect, un isolat clinique, même épidémique, ne serait pas forcément plus virulent qu'un autre. Il apparaît donc important de pouvoir mesurer la virulence intrinsèque d'une souche.

La mise en place d'un modèle cellulaire nécessite de prendre en compte de nombreux paramètres. L'utilisation d'un milieu gélosé produit une population hétérogène. Le milieu liquide génère une population homogène et permet de contrôler la nature de la phase de croissance, exponentielle ou stationnaire, en jouant sur la turbidité de la suspension bactérienne (93). Le phénotype microbien est sous la dépendance du nombre de repiquages subits par la souche, du temps de culture préalable au test, et de la nature du milieu de culture. Alli *et al.* montre que cytolysse et cinétique de croissance, mesurées pour une même souche, ne donnent pas des résultats concordants permettant d'apprécier la virulence de l'isolat (2).

Nous avons choisi de travailler sur des macrophages dérivés des cellules monocytaires THP-1, particulièrement robustes et simples d'utilisation (120). La PCR en temps réel est utilisée ici en parallèle avec la méthode des UFCs pour validation. Son utilisation permettrait de réduire le temps de manipulation nécessaire à la quantification bactérienne. Ce moyen de quantification d'un inoculum bactérien intracellulaire a déjà été utilisé avec succès dans plusieurs études (108; 106). Nous montrons ici qu'il existe une bonne corrélation entre les deux méthodes de quantification.

Dans notre modèle, la souche Paris a l'inoculum initial le plus fort, la pénétration intracellulaire la plus importante et la croissance la plus faible. Pour autant, elle atteint une concentration finale proche de celle de la souche 12* dont l'inoculum est faible et la croissance forte. Il est probable que les trois cinétiques soient soumises à un effet inoculum important. Lorsque celui-ci est fort, la saturation du milieu est rapidement atteinte et freine la croissance. Lorsqu'il est faible, le milieu reste plus longtemps favorable à une croissance forte. Quelle que soit la croissance, la concentration atteinte est du même ordre de grandeur pour les souches Paris et 12*. Il existe par contre une différence significative pour un risque d'erreur de 5% entre la concentration finale de la souche Lens et celle de la souche

Paris. Cette observation pourrait être un marqueur de la plus grande virulence de la souche Lens, épidémique, par rapport à la souche Paris, endémique.

Notre modèle doit cependant être mieux standardisé. Il est notamment nécessaire d'évaluer la reproductibilité de cette expérience en variant les inoculums. La mise en place d'un modèle de mesure de la virulence devra faire l'objet d'une étude à part entière.

La réponse stringente est un modèle largement exploré sur le plan moléculaire (78; 62; 119; 93). Toutefois, ce travail constitue la première étude sur la variabilité des gènes impliqués dans la réponse stringente, *relA*, *rpoS* et *spoT*. Il permettra de compléter les séquences-types (ST) que Gaia *et al.* assignent à chaque souche étudiée par SBT (51). En complétant ainsi cette base de données, nous participons à l'optimisation de la technique de typage épidémiologique proposée par cette même équipe (50). Pour l'instant, le nombre de gènes à séquencer, cinq, est trop important. L'idéal serait de le réduire à trois pour pouvoir faire de cette méthode un nouveau standard en routine épidémiologique. L'accumulation de données permettra de découvrir des gènes plus informatifs sur les critères étudiés. *RelA* est d'ailleurs un marqueur épidémiologique potentiel. Chez *E. coli*, il est montré que les gènes de la réponse stringente sont des cibles de la sélection naturelle et que certains permettent d'améliorer la compétitivité des souches en mutant (32). Ce sont donc des marqueurs de l'évolution moléculaire, probablement capable de séparer les légionelles ayant une histoire évolutive distincte. Dans cette étude, nous montrons que *relA* permet de séparer huit allèles pour 17 souches testées alors que certains gènes inclus dans la technique ne séparent que dix allèles pour 79 souches (*pilE*). De plus, il est discriminant sur le critère des pulsotypes et permet ici d'identifier les souches Paris.

La suite de ce travail sera le séquençage des gènes *spoT* et *rpoS* et l'étude de leur distribution allélique sur les critères de virulence définis en modèle cellulaire *in vitro*.

Conclusion

MEMOIRE SOUTENU PAR : Marion LEVAST

TITRE :

Etude du polymorphisme de séquence nucléique des gènes impliqués dans la réponse stringente chez *Legionella pneumophila*.

CONCLUSION

Legionella pneumophila de sérogroupe 1 est responsable de 99% des légionelloses en France. Toutefois, certaines souches environnementales semblent peu pathogènes chez l'homme et les souches impliquées en clinique ne sont pas toutes épidémiques. Elles peuvent être endémiques ou associées à des cas sporadiques. Il existe donc une hétérogénéité du pouvoir pathogène au sein des *L. pneumophila* de sérogroupe 1.

Dans ce contexte, il est intéressant de définir des marqueurs de virulence, phénotypiques et génomiques. En matière de santé publique, un marqueur de virulence permettrait de repérer les souches à potentiel épidémique dans le cadre de l'évaluation des risques liés à la contamination d'un réseau d'eau par *L. pneumophila* 1. Sur le plan thérapeutique, un marqueur de virulence peut constituer une cible pour le développement de nouveaux antibiotiques. Enfin, cette recherche de marqueur participe à la meilleure connaissance des mécanismes de pathogénicité de *L. pneumophila*. Plusieurs équipes ont déjà tenté de faire correspondre la variabilité du phénotype des souches de *L. pneumophila* avec la variabilité des séquences de certains gènes, sans succès.

Nous proposons ici l'étude du polymorphisme des gènes *relA*, *rpoS* et *spoT* chez *L. pneumophila* de sérogroupe 1. Ces gènes codent pour des régulateurs globaux, pléiotropes, impliqués dans la réponse au stress des bactéries. Chez *L. pneumophila*, ils régissent l'alternance phénotypique du bacille, indispensable au développement de son cycle intracellulaire. En situation de carence nutritive, ils permettent la survie bactérienne en favorisant l'expression de la virulence. Chez *Escherichia coli*, ils sont une cible préférentielle de la sélection naturelle. Ce sont donc potentiellement des marqueurs de l'évolution moléculaire. *RpoS* et *spoT* ont été étudiés pour les souches Lens, Paris et Philadelphia. Le gène *relA* a été séquencé chez 17 isolats, environnementaux et cliniques.


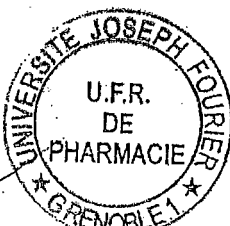
Parmi les *L. pneumophila* d'origine clinique, nous avons sélectionné des souches épidémiques et d'autres endémiques. Les deux critères de virulence testés sont la source et le profil épidémiologique des isolats. Parallèlement, nous avons réalisé un travail préliminaire, basé sur la culture de ces différents types de souches en cellules THP-1. Le but est de caractériser un isolat par le phénotype qu'il exprime *in vitro*, de manière à obtenir un troisième critère de virulence, objectif, non basé sur l'épidémiologie.

Les séquences des gènes *rpoS* et *spoT* ont une faible variabilité au sein des souches Lens, Paris et Philadelphia. Pour 17 souches séquencées, *relA* présente huit allèles différents. Leur distribution ne permet pas de regrouper les isolats sur les critères de source, clinique ou environnementale, ou de profil épidémiologique des souches. Elle permet par contre d'identifier le pulsotype Paris. Ce gène possède donc un pouvoir discriminant intéressant en matière d'épidémiologie. Il pourra servir à compléter les séquences géniques utilisées dans la technique de SBT pour le typage génotypique des souches *L. pneumophila*. Les perspectives de ce travail sont le séquençage de *rpoS* et *spoT* et l'étude de leur distribution allélique sur les critères de virulence définis en modèle cellulaire *in vitro*.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

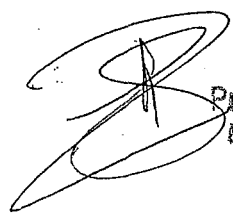
Grenoble, le 15 décembre 2005

LE DOYEN

Professeur P. Demenge

LE PRESIDENT DU MEMOIRE

 Pr. Renée GRILLOT
U.F.R. Pharmacie

Professeur R. Grillot

Références bibliographiques

- 1 ADELEKE A., PRUCKLER J., BENSON R., ROWBOTHAM T., HALABLAB M. and FIELDS B. (1996). Legionella-like amebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease. Emerg Infect Dis. **2**: 225-30.
- 2 ALLI O.A., ZINK S., VON LACKUM N.K. and ABU-KWAIK Y. "Comparative assessment of virulence traits in *Legionella* spp." Microbiology (2003) 149 (Pt 3): 631-41.
- 3 AURELL H., ETIENNE J., FOREY F., REYROLLE M., GIRARDO P., FARGE P., *et al.* "*Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France." J Clin Microbiol (2003) 41 (7): 3320-2.
- 4 AURELL H., FARGE P., MEUGNIER H., GOUY M., FOREY F., LINA G., *et al.* "Clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 cannot be distinguished by sequence analysis of two surface protein genes and three housekeeping genes." Appl Environ Microbiol (2005) 71 (1): 282-9.
- 5 BACHMAN M.A. and SWANSON M.S. "Genetic evidence that *Legionella pneumophila* RpoS modulates expression of the transmission phenotype in both the exponential phase and the stationary phase." Infect Immun (2004) 72 (5): 2468-76.
- 6 BANDYOPADHYAY P., BYRNE B., CHAN Y., SWANSON M.S. and STEINMAN H.M. "*Legionella pneumophila* catalase-peroxidases are required for proper trafficking and growth in primary macrophages." Infect Immun (2003) 71 (8): 4526-35.
- 7 BARKER J., BROWN M.R., COLLIER P.J., FARRELL I. and GILBERT P. "Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation." Appl Environ Microbiol (1992) 58 (8): 2420-5.
- 8 BARKER J., SCAIFE H. and BROWN M.R. "Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*." Antimicrob Agents Chemother (1995) 39 (12): 2684-8.
- 9 BELLINGER-KAWAHARA C. and HORWITZ M.A. "Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes." J Exp Med (1990) 172 (4): 1201-10.
- 10 BENSON R.F. and FIELDS B.S. "Classification of the genus *Legionella*." Semin Respir Infect (1998) 13 (2): 90-9.
- 11 BENSON R.F., THACKER W.L., DANESHVAR M.I. and BRENNER D.J. "*Legionella waltersii* sp. nov. and an unnamed *Legionella* genomospecies isolated from water in Australia." Int J Syst Bacteriol (1996) 46 (3): 631-4.
- 12 BEZANSON G., FERNANDEZ R., HALDANE D., BURBRIDGE S. and MARRIE T. "Virulence of patient and water isolates of *Legionella pneumophila* in guinea pigs and mouse L929 cells varies with bacterial genotype." Can J Microbiol (1994) 40 (6): 426-31.
- 13 BIRTLES R.J., ROWBOTHAM T.J., RAOULT D. and HARRISON T.G. "Phylogenetic diversity of intra-amoebal *Legionellae* as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison." Microbiology (1996) 142 (Pt 12): 3525-30.

- 14 BLOCK R. and HASELTINE A.W. "Purification and properties of stringent factor." J Biol Chem (1975) 250 (4): 1212-7.
- 15 BOSHUIZEN H.C., NEPPELENBROEK S.E., VAN VLIET H., SCHELLEKENS J.F., DEN BOER J.W., PEETERS M.F., *et al.* "Subclinical *Legionella* infection in workers near the source of a large outbreak of Legionnaires disease." J Infect Dis (2001) 184 (4): 515-8.
- 16 BRENNER D.J., STEIGERWALT A.G., EPPLE P., BIBB W.F., MCKINNEY R.M., STARNES R.W., *et al.* "*Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. *nov.*, *L. pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. *nov.*, and *L. pneumophila* subsp. *pascullei* subsp. *nov.*" J Clin Microbiol (1988) 26 (9): 1695-703.
- 17 BRIELAND J., FREEMAN P., KUNKEL R., CHRISP C., HURLEY M., FANTONE J., *et al.* "Replicative *Legionella pneumophila* lung infection in intratracheally inoculated A/J mice. A murine model of human Legionnaires' disease." Am J Pathol (1994) 145 (6): 1537-46.
- 18 BRIELAND J.K., FANTONE J.C., REMICK D.G., LEGENDRE M., MCCLAIN M. and ENGLEBERG N.C. "The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease." Infect Immun (1997) 65 (12): 5330-3.
- 19 BROWN A., VICKERS R.M., ELDER E.M., LEMA M. and GARRITY G.M. "Plasmid and surface antigen markers of endemic and epidemic *Legionella pneumophila* strains." J Clin Microbiol (1982) 16 (2): 230-5.
- 20 BUMBAUGH A.C., MCGRAW E.A., PAGE K.L., SELANDER R.K. and WHITTAM T.S. "Sequence polymorphism of *dotA* and *mip* alleles mediating invasion and intracellular replication of *Legionella pneumophila*." Curr Microbiol (2002) 44 (5): 314-22.
- 21 BYRNE B. and SWANSON M.S. "Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions." Infect Immun (1998) 66 (7): 3029-34.
- 22 CAMPESE C., JARRAUD S., BITAR D., MAINE C. and CHE D. "Les légionelloses survenues en France en 2004." BEH (2005) 26: 129-132.
- 23 CARRATALA J., GUDIOL F., PALLARES R., DORCA J., VERDAGUER R., ARIZA J., *et al.* "Risk factors for nosocomial *Legionella pneumophila* pneumonia." Am J Respir Crit Care Med (1994) 149 (3 Pt 1): 625-9.
- 24 CAZALET C., RUSNIOK C., BRUGGEMANN H., ZIDANE N., MAGNIER A., MA L., *et al.* "Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity." Nat Genet (2004) 36 (11): 1165-73.
- 25 CHENNA R., SUGAWARA H., KOIKE T., LOPEZ R., GIBSON T.J., HIGGINS D.G., *et al.* "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs." Nucleic Acids Res (2003) 31 (13): 3497-500.
- 26 CHIEN M., MOROZOVA I., SHI S., SHENG H., CHEN J., GOMEZ S.M., *et al.* "The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*." Science (2004) 305 (5692): 1966-8.

- 27 CIANCIOTTO N.P. and FIELDS B.S. "*Legionella pneumophila mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A (1992) 89 (11): 5188-91.
- 28 CIRILLO J.D., CIRILLO S.L., YAN L., BERMUDEZ L.E., FALKOW S. and TOMPKINS L.S. "Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*." Infect Immun (1999) 67 (9): 4427-34.
- 29 CIRILLO J.D., FALKOW S. and TOMPKINS L.S. "Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion." Infect Immun (1994) 62 (8): 3254-61.
- 30 CIRILLO S.L., BERMUDEZ L.E., EL-ETR S.H., DUHAMEL G.E. and CIRILLO J.D. "*Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence." Infect Immun (2001) 69 (1): 508-17.
- 31 CONOVER G.M., DERRE I., VOGEL J.P. and ISBERG R.R. "The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity." Mol Microbiol (2003) 48 (2): 305-21.
- 32 COOPER T.F., ROZEN D.E. and LENSKI R.E. "Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Escherichiacoli*." Proc Natl Acad Sci U S A (2003) 100 (3): 1072-7.
- 33 DENNIS P.J., BRENNER D.J., THACKER W.L., WAIT R., VESEY G., STEIGERWALT A.G., *et al.* "Five new *Legionella* species isolated from water." Int J Syst Bacteriol (1993) 43 (2): 329-37.
- 34 DIETRICH C., HEUNER K., BRAND B.C., HACKER J. and STEINERT M. "Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells." Infect Immun (2001) 69 (4): 2116-22.
- 35 DOLEANS A., AURELL H., REYROLLE M., LINA G., FRENEY J., VANDENESCH F., *et al.* "Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different." J Clin Microbiol (2004) 42 (1): 458-60.
- 36 EDELSTEIN P.H. "Legionnaires' disease." N Engl J Med (1998) 338 (3): 200-1.
- 37 EDELSTEIN P.H., BEER K.B. and DEBOYNTON E.D. "Influence of growth temperature on virulence of *Legionella pneumophila*." Infect Immun (1987) 55 (11): 2701-5.
- 38 ENGLEBERG N.C., CARTER C., WEBER D.R., CIANCIOTTO N.P. and EISENSTEIN B.I. "DNA sequence of *mip*, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity." Infect Immun (1989) 57 (4): 1263-70.
- 39 ENRIGHT M.C. and SPRATT B.G. "A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease." Microbiology (1998) 144 (Pt 11): 3049-60.
- 40 FIELDS B.S. "The molecular ecology of *legionellae*." Trends Microbiol (1996) 4 (7): 286-90.
- 41 FIELDS B.S., BENSON R.F. and BESSER R.E. "*Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation." Clin Microbiol Rev (2002) 15 (3): 506-26.

- 42 FIELDS B.S., BENSON R.F. and BESSER R.E. (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev. **15**: 506-26.
- 43 FIELDS B.S., SHOTTS E.B., JR., FEELEY J.C., GORMAN G.W. and MARTIN W.T. "Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*." Appl Environ Microbiol (1984) 47 (3): 467-71.
- 44 FISCHER G., BANG H., LUDWIG B., MANN K. and HACKER J. "Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPlase) activity." Mol Microbiol (1992) 6 (10): 1375-83.
- 45 FLIEGER A., GONG S., FAIGLE M., STEVANOVIC S., CIANCIOOTTO N.P. and NEUMEISTER B. "Novel lysophospholipase A secreted by *Legionella pneumophila*." J Bacteriol (2001) 183 (6): 2121-4.
- 46 FLIERMANS C.B., CHERRY W.B., ORRISON L.H., SMITH S.J., TISON D.L. and POPE D.H. "Ecological distribution of *Legionella pneumophila*." Appl Environ Microbiol (1981) 41 (1): 9-16.
- 47 FRASER D.W. "The challenges were legion." Lancet Infect Dis (2005) 5 (4): 237-41.
- 48 FRY N.K., ALEXIOU-DANIEL S., BANGSBORG J.M., BERNANDER S., CASTELLANI PASTORIS M., ETIENNE J., *et al.* "A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study." Clin Microbiol Infect (1999) 5 (8): 462-477.
- 49 FRY N.K., WARWICK S., SAUNDERS N.A. and EMBLEY T.M. "The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*." J Gen Microbiol (1991) 137 (5): 1215-22.
- 50 GAIA V., FRY N.K., AFSHAR B., LUCK P.C., MEUGNIER H., ETIENNE J., *et al.* "Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*." J Clin Microbiol (2005) 43 (5): 2047-52.
- 51 GAIA V., FRY N.K., HARRISON T.G. and PEDUZZI R. "Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation." J Clin Microbiol (2003) 41 (7): 2932-9.
- 52 GARDUNO R.A., GARDUNO E. and HOFFMAN P.S. "Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model." Infect Immun (1998) 66 (10): 4602-10.
- 53 GARDUNO R.A., QUINN F.D. and HOFFMAN P.S. "HeLa cells as a model to study the invasiveness and biology of *Legionella pneumophila*." Can J Microbiol (1998) 44 (5): 430-40.
- 54 GARRITY G.M., BROWN A. and VICKERS R.M. "*Tatlockia* and *Fluoribacter* : two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*." Int J Syst Bacteriol (1980) 30: 609-14.
- 55 GENTRY D.R. and CASHEL M. "Mutational analysis of the *Escherichia coli* *spot* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation." Mol Microbiol (1996) 19 (6): 1373-84.

- 56 GENTRY D.R., HERNANDEZ V.J., NGUYEN L.H., JENSEN D.B. and CASHEL M. "Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp." J Bacteriol (1993) 175 (24): 7982-9.
- 57 GRUNDMANN H., HORI S., ENRIGHT M.C., WEBSTER C., TAMI A., FEIL E.J., *et al.* "Determining the genetic structure of the natural population of *Staphylococcus aureus*: a comparison of multilocus sequence typing with pulsed-field gel electrophoresis, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and phage typing." J Clin Microbiol (2002) 40 (12): 4544-6.
- 58 HAGELE S., HACKER J. and BRAND B.C. "*Legionella pneumophila* kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death." FEMS Microbiol Lett (1998) 169 (1): 51-8.
- 59 HALES L.M. and SHUMAN H.A. "The *Legionella pneumophila rpoS* gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*." J Bacteriol (1999) 181 (16): 4879-89.
- 60 HAMMER B.K. and SWANSON M.S. "Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp." Mol Microbiol (1999) 33 (4): 721-31.
- 61 HARB O.S. and ABU KWAIK Y. "Identification of the aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase gene of *Legionella pneumophila* and characterization of a null mutant." Infect Immun (1998) 66 (5): 1898-903.
- 62 HARB O.S., GAO L.Y. and ABU KWAIK Y. "From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens." Environ Microbiol (2000) 2 (3): 251-65.
- 63 HELLER R., HOLLER C., SUSSMUTH R. and GUNDERMANN K.O. "Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*." Lett Appl Microbiol (1998) 26 (1): 64-8.
- 64 HENGGE-ARONIS R. "Survival of hunger and stress: the role of RpoS in early stationary phase gene regulation in *E. coli*." Cell (1993) 72 (2): 165-8.
- 65 HENKE M. and SEIDEL K.M. "Association between *Legionella pneumophila* and amoebae in water." Isr J Med Sci (1986) 22 (9): 690-5.
- 66 HEUNER K., BENDER-BECK L., BRAND B.C., LUCK P.C., MANN K.H., MARRE R., *et al.* "Cloning and genetic characterization of the flagellum subunit gene (*flaA*) of *Legionella pneumophila* serogroup 1." Infect Immun (1995) 63 (7): 2499-507.
- 67 HEUNER K. and STEINERT M. "The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype." Int J Med Microbiol (2003) 293 (2-3): 133-43.
- 68 HICKEY E.K. and CIANCIOOTTO N.P. "An iron- and fur-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases." Infect Immun (1997) 65 (1): 133-43.
- 69 HOFFMAN P.S. and GARDUNO R.A. "Surface-associated heat shock proteins of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori*: roles in pathogenesis and immunity." Infect Dis Obstet Gynecol (1999) 7 (1-2): 58-63.

- 70 JISHAGE M., KVINT K., SHINGLER V. and NYSTROM T. "Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp." Genes Dev (2002) 16 (10): 1260-70.
- 71 KATZ S.M. and HAMMEL J.M. "The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*." Ann Clin Lab Sci (1987) 17 (3): 150-6.
- 72 KING C.H., FIELDS B.S., SHOTTS E.B., JR. and WHITE E.H. "Effects of cytochalasin D and methylamine on intracellular growth of *Legionella pneumophila* in amoebae and human monocyte-like cells." Infect Immun (1991) 59 (3): 758-63.
- 73 KO K.S., HONG S.K., LEE H.K., PARK M.Y. and KOOK Y.H. "Molecular evolution of the dotA gene in *Legionella pneumophila*." J Bacteriol (2003) 185 (21): 6269-77.
- 74 KO K.S., LEE H.K., PARK M.Y. and KOOK Y.H. "Mosaic structure of pathogenicity islands in *Legionella pneumophila*." J Mol Evol (2003) 57 (1): 63-72.
- 75 KO K.S., LEE H.K., PARK M.Y., LEE K.H., YUN Y.J., WOO S.Y., *et al.* "Application of RNA polymerase beta-subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species." J Clin Microbiol (2002) 40 (7): 2653-8.
- 76 KOHLER R., FANGHANEL J., KONIG B., LUNEBERG E., FROSCHE M., RAHFELD J.U., *et al.* "Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*." Infect Immun (2003) 71 (8): 4389-97.
- 77 KUNISHIMA H., TAKEMURA H., YAMAMOTO H., KANEMITSU K. and SHIMADA J. "Evaluation of the activity of antimicrobial agents against *Legionella pneumophila* multiplying in a human monocytic cell line, THP-1, and an alveolar epithelial cell line, A549." J Infect Chemother (2000) 6 (4): 206-10.
- 78 KWAIK Y.A. "Fatal attraction of mammalian cells to *Legionella pneumophila*." Mol Microbiol (1998) 30 (4): 689-95.
- 79 LAMMERTYN E. and ANNE J. "Protein secretion in *Legionella pneumophila* and its relation to virulence." FEMS Microbiol Lett (2004) 238 (2): 273-9.
- 80 LEE T.C., VICKERS R.M., YU V.L. and WAGENER M.M. "Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study." J Clin Microbiol (1993) 31 (10): 2764-8.
- 81 LILES M.R., SCHEEL T.A. and CIANCOTTO N.P. "Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*." J Bacteriol (2000) 182 (3): 749-57.
- 82 LILES M.R., VISWANATHAN V.K. and CIANCOTTO N.P. "Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion." Infect Immun (1998) 66 (4): 1776-82.
- 83 LO PRESTI F., RIFFARD S., MEUGNIER H., REYROLLE M., LASNE Y., GRIMONT P.A., *et al.* "*Legionella gresilensis* sp. nov. and *Legionella beliardensis* sp. nov., isolated from water in France." Int J Syst Evol Microbiol (2001) 51 (Pt 6): 1949-57.
- 84 LOPEZ P., CASANE D. and PHILIPPE H. "Phylogénie et évolution moléculaires." M/S (2002) 18: 1146-54.

- 85 LUNEBERG E., MAYER B., DARYAB N., KOOISTRA O., ZHRINGER U., ROHDE M., *et al.* "Chromosomal insertion and excision of a 30 kb unstable genetic element is responsible for phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*." Mol Microbiol (2001) 39 (5): 1259-71.
- 86 LUNEBERG E., ZHRINGER U., KNIREL Y.A., STEINMANN D., HARTMANN M., STEINMETZ I., *et al.* "Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*." J Exp Med (1998) 188 (1): 49-60.
- 87 LYNCH D., FIESER N., GLOGGLER K., FORSBACH-BIRK V. and MARRE R. "The response regulator LetA regulates the stationary-phase stress response in *Legionella pneumophila* and is required for efficient infection of *Acanthamoeba castellanii*." FEMS Microbiol Lett (2003) 219 (2): 241-8.
- 88 MAURIN M. and RAOULT D. "Q fever." Clin Microbiol Rev (1999) 12 (4): 518-53.
- 89 MENGAUD J.M. and HORWITZ M.A. "The major iron-containing protein of *Legionella pneumophila* is an aconitase homologous with the human iron-responsive element-binding protein." J Bacteriol (1993) 175 (17): 5666-76.
- 90 MERRIAM J.J., MATHUR R., MAXFIELD-BOUMIL R. and ISBERG R.R. "Analysis of the *Legionella pneumophila* *fliI* gene: intracellular growth of a defined mutant defective for flagellum biosynthesis." Infect Immun (1997) 65 (6): 2497-501.
- 91 MIQUEL P.H., HAEGHEBAERT S., CHE D., CAMPESE C., GUITARD C., BRIGAUD T., *et al.* "Epidémie communautaire de légionellose, Pas-de-Calais, France, novembre 2003-janvier 2004." BEH (2004) 36-37: 179-84.
- 92 MOLOFSKY A.B. and SWANSON M.S. "*Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication." Mol Microbiol (2003) 50 (2): 445-61.
- 93 MOLOFSKY A.B. and SWANSON M.S. "Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle." Mol Microbiol (2004) 53 (1): 29-40.
- 94 MUDER R.R. and YU V.L. "Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*." Clin Infect Dis (2002) 35 (8): 990-8.
- 95 MURGA R., FORSTER T.S., BROWN E., PRUCKLER J.M., FIELDS B.S. and DONLAN R.M. "Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system." Microbiology (2001) 147 (Pt 11): 3121-6.
- 96 NAGAI H., KAGAN J.C., ZHU X., KAHN R.A. and ROY C.R. "A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes." Science (2002) 295 (5555): 679-82.
- 97 NAGAI H. and ROY C.R. "The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter." Embo J (2001) 20 (21): 5962-70.
- 98 NEI M. and GOJOBORI T. "Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions." Mol Biol Evol (1986) 3 (5): 418-26.

- 99 NIELSEN K., BANGSBORG J.M. and HOIBY N. "Susceptibility of *Legionella* species to five antibiotics and development of resistance by exposure to erythromycin, ciprofloxacin, and rifampicin." Diagn Microbiol Infect Dis (2000) 36 (1): 43-8.
- 100 OTT M., MESSNER P., HEESEMANN J., MARRE R. and HACKER J. "Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*." J Gen Microbiol (1991) 137 (8): 1955-61.
- 101 PARK M.Y., KO K.S., LEE H.K., PARK M.S. and KOOK Y.H. "*Legionella busanensis* sp. nov., isolated from cooling tower water in Korea." Int J Syst Evol Microbiol (2003) 53 (Pt 1): 77-80.
- 102 PRUCKLER J.M., MERMEL L.A., BENSON R.F., GIORGIO C., CASSIDAY P.K., BREIMAN R.F., *et al.* "Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations." J Clin Microbiol (1995) 33 (11): 2872-5.
- 103 RAJKUMARI K. and GOWRISHANKAR J. "An N-terminally truncated RpoS (sigma(S)) protein in *Escherichia coli* is active in vivo and exhibits normal environmental regulation even in the absence of *rpoS* transcriptional and translational control signals." J Bacteriol (2002) 184 (12): 3167-75.
- 104 RANGEL-FRAUSTO M.S., RHOMBERG P., HOLLIS R.J., PFALLER M.A., WENZEL R.P., HELMS C.M., *et al.* "Persistence of *Legionella pneumophila* in a hospital's water system: a 13-year survey." Infect Control Hosp Epidemiol (1999) 20 (12): 793-7.
- 105 RIBOLDI-TUNNICLIFFE A., KONIG B., JESSEN S., WEISS M.S., RAHFELD J., HACKER J., *et al.* "Crystal structure of Mip, a prolyl isomerase from *Legionella pneumophila*." Nat Struct Biol (2001) 8 (9): 779-83.
- 106 ROCH N. and MAURIN M. "Antibiotic susceptibilities of *Legionella pneumophila* strain Paris in THP-1 cells as determined by real-time PCR assay." J Antimicrob Chemother (2005) 55 (6): 866-71.
- 107 ROIG J. and RELLO J. "Legionnaires' disease: a rational approach to therapy." J Antimicrob Chemother (2003) 51 (5): 1119-29.
- 108 ROLAIN J.M., MALLET M.N., FOURNIER P.E. and RAOULT D. "Real-time PCR for universal antibiotic susceptibility testing." J Antimicrob Chemother (2004) 54 (2): 538-41.
- 109 ROMEO T. "Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB." Mol Microbiol (1998) 29 (6): 1321-30.
- 110 ROSSIER O. and CIANCOTTO N.P. "Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*." Infect Immun (2001) 69 (4): 2092-8.
- 111 ROY C.R. and ISBERG R.R. "Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages." Infect Immun (1997) 65 (2): 571-8.
- 112 SADOSKY A.B., WILSON J.W., STEINMAN H.M. and SHUMAN H.A. "The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability." J Bacteriol (1994) 176 (12): 3790-9.

- 113 SAMRAKANDI M.M., CIRILLO S.L., RIDENOUR D.A., BERMUDEZ L.E. and CIRILLO J.D. "Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains." J Clin Microbiol (2002) 40 (4): 1352-62.
- 114 SEVERINOV K., MUSTAEV A., KUKARIN A., MUZZIN O., BASS I., DARST S.A., *et al.* "Structural modules of the large subunits of RNA polymerase. Introducing archaeobacterial and chloroplast split sites in the beta and beta' subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase." J Biol Chem (1996) 271 (44): 27969-74.
- 115 ST JOHN G. and STEINMAN H.M. "Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*: role in stationary-phase survival." J Bacteriol (1996) 178 (6): 1578-84.
- 116 STONE B.J. and ABU KWAIK Y. "Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells." Infect Immun (1998) 66 (4): 1768-75.
- 117 STOUT J.E. and YU V.L. "Legionellosis." N Engl J Med (1997) 337 (10): 682-7.
- 118 STUDEMANN A., NOIRCLERC-SAVOYE M., KLAUCK E., BECKER G., SCHNEIDER D. and HENGGE R. "Sequential recognition of two distinct sites in sigma(S) by the proteolytic targeting factor RssB and ClpX." Embo J (2003) 22 (16): 4111-20.
- 119 SWANSON M.S. and HAMMER B.K. "*Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages." Annu Rev Microbiol (2000) 54: 567-613.
- 120 TSUCHIYA S., YAMABE M., YAMAGUCHI Y., KOBAYASHI Y., KONNO T. and TADA K. "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." Int J Cancer (1980) 26 (2): 171-6.
- 121 VINELLA D., ALBRECHT C., CASHEL M. and D'ARI R. "Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*." Mol Microbiol (2005) 56 (4): 958-70.
- 122 VISWANATHAN V.K., EDELSTEIN P.H., POPE C.D. and CIANCIOOTTO N.P. "The *Legionella pneumophila* *iraAB* locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence." Infect Immun (2000) 68 (3): 1069-79.
- 123 VOGEL J.P. and ISBERG R.R. "Cell biology of *Legionella pneumophila*." Curr Opin Microbiol (1999) 2 (1): 30-4.
- 124 WELLINGHAUSEN N., FROST C. and MARRE R. "Detection of *Legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR." Appl Environ Microbiol (2001) 67 (9): 3985-93.
- 125 WENDRICH T.M. and MARAHIEL M.A. "Cloning and characterization of a *relA/spoT* homologue from *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol (1997) 26 (1): 65-79.
- 126 ZUSMAN T., GAL-MOR O. and SEGAL G. "Characterization of a *Legionella pneumophila* *relA* insertion mutant and roles of *RelA* and *RpoS* in virulence gene expression." J Bacteriol (2002) 184 (1): 67-75.

Annexes

Annexe 1

Quantification bactérienne par PCR en temps réel – Résultats

Valeurs en copies par mL de l'inoculum I₀ et des charges bactériennes obtenues en culture cellulaire THP-1 aux temps H1, H6, H22, H30, H46 et H53 pour chacune des souches *Legionella pneumophila* 12*, Paris et Lens.

En gras, sont notées les valeurs moyennes obtenues pour chaque triplet. Sous chaque moyenne, figure l'écart type correspondant, en italique.

	I ₀	H1	H6	H22	H30	H46	H53
12*	3,4E+06	3,8E+03	5,8E+03	3,4E+04	7,5E+04	2,9E+05	1,1E+06
			5,8E+03	3,7E+04	6,4E+04	5,2E+05	1,5E+06
		4,2E+03	6,9E+03	5,0E+04	1,0E+05	5,0E+05	1,1E+06
		4,0E+03	6,2E+03	4,1E+04	8,1E+04	4,4E+05	1,3E+06
		<i>1,9E+02</i>	<i>5,0E+02</i>	<i>7,0E+03</i>	<i>1,7E+04</i>	<i>1,0E+05</i>	<i>2,0E+05</i>
Paris	7,0E+06	1,2E+05	1,1E+05	3,6E+05	7,0E+05	1,2E+06	1,2E+06
		1,1E+05	1,0E+05	2,8E+05	3,3E+05	1,3E+06	1,8E+06
			1,2E+05	2,7E+05	5,0E+05	2,0E+06	2,1E+06
		1,1E+05	1,1E+05	3,0E+05	5,1E+05	1,5E+06	1,9E+06
		<i>6,4E+03</i>	<i>1,0E+04</i>	<i>4,2E+04</i>	<i>1,5E+05</i>	<i>3,6E+05</i>	<i>3,7E+05</i>
Lens	5,2E+06	2,1E+04	2,6E+04	5,4E+05	1,0E+06	3,8E+06	3,7E+06
		2,4E+04	4,8E+04	5,8E+05	1,0E+06	5,1E+06	5,1E+06
			3,4E+04	3,8E+05	8,6E+05	3,7E+06	4,9E+06
		2,3E+04	3,6E+04	5,0E+05	9,6E+05	4,2E+06	4,6E+06
		<i>1,5E+03</i>	<i>8,9E+03</i>	<i>8,5E+04</i>	<i>7,3E+04</i>	<i>6,4E+05</i>	<i>6,4E+05</i>

Annexe 2

Quantification bactérienne par dénombrement des UFCs – Résultats

Valeurs en UFCs par mL des charges bactériennes obtenues en culture cellulaire THP-1 aux temps H1, H6, H22, H30, H46 et H53 pour chacune des souches *Legionella pneumophila* 12*, Paris et Lens.

En gras, sont notées les valeurs moyennes obtenues pour chaque triplet. Sous chaque moyenne, figure l'écart type correspondant, en italique.

	1	30	46	53
Souche 12*	1,2E+03	4,5E+03	3,7E+04	4,9E+04
	<i>2,2E+02</i>	<i>1,2E+03</i>	<i>6,0E+03</i>	<i>4,7E+03</i>
Souche Paris	1,4E+03	2,0E+04	2,0E+05	2,1E+05
	<i>3,6E+02</i>	<i>8,5E+03</i>	<i>8,7E+04</i>	<i>7,3E+04</i>
Souche Lens	2,0E+03	1,2E+05	6,8E+05	1,8E+06
	<i>5,9E+02</i>	<i>9,4E+03</i>	<i>4,5E+04</i>	<i>2,9E+05</i>

Annexe 3

Résultats du test de corrélation effectué entre les deux techniques de quantification bactérienne grâce au logiciel STATVIEW.

Données :

CFUs_mL_12	Copies_mL_12	CFUs_mL_Paris	Copies_mL_Paris	CFUs_mL_Lens	Copies_mL_Lens
1200	4030	1400	112000	2000	22500
4500	80900	20000	509000	120000	961000
3700	435000	200000	1540000	680000	4190000
49000	1260000	210000	1960000	1800000	4560000

Résultats :

Matrice de corrélation

	CFUs_mL_12	Copies_mL_12
CFUs_mL_12	1,000	,952
Copies_mL_12	,952	1,000

4 observations ont été utilisées dans ce calcul.

Matrice de corrélation

	CFUs_mL_Paris	Copies_mL_Paris
CFUs_mL_Paris	1,000	,979
Copies_mL_Paris	,979	1,000

4 observations ont été utilisées dans ce calcul.

Matrice de corrélation

	CFUs_mL_Lens	Copies_mL_Lens
CFUs_mL_Lens	1,000	,862
Copies_mL_Lens	,862	1,000

4 observations ont été utilisées dans ce calcul.

Annexe 4

Alignement des séquences nucléiques du gène *relA* des 17 souches sélectionnées.

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

Lp6      ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGATGCCAGATGGCAGTATCGACGTAGAGATG
13*     ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGACGCCAGATGGCAGTATTGACGTAGAGATG
6        ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGACGCCAGATGGCAGTATTGACGTAGAGATG
8        ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGACGCCAGATGGCAGTATTGACGTAGAGATG
5        ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGACGCCAGATGGCAGTATTGACGTAGAGATG
7        ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGACGCCAGATGGCAGTATTGACGTAGAGATG
10*     ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGATGCCAGATGGCAGTATCGACGTAGAGATG
12*     ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGACGCCAGATGGCAGTATTGACGTAGAGATG
Lp5     ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGACGCCAGATGGCAGTATTGACGTAGAGATG
Paris   ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGATGCCAGATGGCAGTATCGACGTAGAGATG
9*      ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGATGCCAGATGGCAGTATTGACGTAGAGATG
11*     ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGATGCCAGATGGCAGTATCGACGTAGAGATG
Lt*     ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGATGCCAGATGGCAGTATCGACGTAGAGATG
4        ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGACGCCAGATGGCAGTATTGACGTAGAGATG
16     ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGATGCCAGATGGCAGTATCGACGTAGAGATG
Lens    ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGACGCCAGATGGCAGTATTGACGTAGAGATG
Phi     ATGGTAAGAGTAAAAGATACGACTCCGTTGACGCCAGATGGCAGTATTGACGTAGAGATG
***** * *****

Lp6      TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATACTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCC
13*     TGGTTACATCATCTTGGCTCAAAGGATATTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCC
6        TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATATTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCT
8        TGGTTACATCATCTTGGCTCAAAGGATATTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCC
5        TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATATTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCT
7        TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATATTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCT
10*     TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATACTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCC
12*     TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATATTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCT
Lp5     TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATATTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCT
Paris   TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATACTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCC
9*      TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATACTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCC
11*     TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATACTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCC
Lt*     TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATACTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCC
4        TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATATTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCT
16     TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATACTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCC
Lens    TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATATTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCT
Phi     TGGTTACATCATCTTGGTTCAAAGGATATTTGGATAATCTCGAACTCGTAAGAGCTGCC
*****

Lp6      TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCCACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
13*     TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCTACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
6        TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCTACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
8        TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCTACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
5        TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCTACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
7        TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCTACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
10*     TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCCACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
12*     TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCTACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
Lp5     TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCTACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
Paris   TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCCACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
9*      TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCCACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
11*     TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCCACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
Lt*     TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCCACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
4        TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCTACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
16     TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCCACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
Lens    TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCTACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
Phi     TGTACTTTAAGTCAATTGGCTGGTCAGGATCATGCTACTGAAACAGGGCAAACCTTGTTTA
*****

```

Lp6 CAACAAGGGCTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 13* CAACAAGGGTTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 6 CAACAAGGGTTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 8 CAACAAGGGTTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 5 CAACAAGGGTTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 7 CAACAAGGGTTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 10* CAACAAGGGCTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 12* CAACAAGGGTTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 Lp5 CAACAAGGGTTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 Paris CAACAAGGGCTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 9* CAACAAGGGCTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 11* CAACAAGGGCTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 Lt* CAACAAGGGCTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 4 CAACAAGGGTTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 16 CAACAAGGGCTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 Lens CAACAAGGGTTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG
 Phi CAACAAGGGTTATCAATGGCTGATTTACTTGCTGACCTGGAAGTAGATCAGGAAACTCTG

Lp6 GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTATCTATTGACGATGTTGAA
 13* GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTATCTATTGACGATGTTGAA
 6 GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTGTCTATTGACGATGTTGAA
 8 GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTATCTATTGACGATGTTGAA
 5 GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTGTCTATTGACGATGTTGAA
 7 GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTGTCTATTGACGATGTTGAA
 10* GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTATCTATTGACGATGTTGAA
 12* GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTGTCTATTGACGATGTTGAA
 Lp5 GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTATCTATTGACGATGTTGAA
 Paris GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTATCTATTGACGATGTTGAA
 9* GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTATCTATTGACGATGTTGAA
 11* GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTATCTATTGACGATGTTGAA
 Lt* GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTATCTATTGACGATGTTGAA
 4 GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTGTCTATTGACGATGTTGAA
 16 GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTATCTATTGACGATGTTGAA
 Lens GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTATCTATTGATGATGTTGAA
 Phi GCTGCCGCTATTATTTTTGAAAATGTTTCATTATGCGGATTTATCTATTGACGATGTTGAA
 ** *****

Lp6 GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 13* GAGCAATTGGGACACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 6 GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 8 GAGCAATTGGGACACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 5 GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 7 GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 10* GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 12* GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 Lp5 GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 Paris GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 9* GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 11* GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 Lt* GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 4 GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 16 GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 Lens GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG
 Phi GAGCAATTGGGGCACAATATCGCTAAATTGGTCAAAGGCATAGAAAAAATGAGTGCCATG

Lp6 AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGT
13* AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAACATTCGT
6 AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGT
8 AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAACATTCGT
5 AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGT
7 AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGT
10* AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGT
12* AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGT
Lp5 AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGC
Paris AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGT
9* AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGT
11* AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGT
Lt* AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGT
4 AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGT
16 AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGT
Lens AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGC
Phi AACAAATTTCCAGGCTTTAAATAAATACCCGCAAAAACAAAAATCAAATTGACAATATTCGC

Lp6 AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCGGAGTGT
13* AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCAGAGTGT
6 AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCAGAGTGT
8 AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCAGAGTGT
5 AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCAGAGTGT
7 AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCAGAGTGT
10* AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCGGAGTGT
12* AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCAGAGTGT
Lp5 AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCAGAGTGT
Paris AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCGGAGTGT
9* AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCGGAGTGT
11* AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCGGAGTGT
Lt* AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCGGAGTGT
4 AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCAGAGTGT
16 AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCGGAGTGT
Lens AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCAGAGTGT
Phi AAAATGCTCCTTGCGATGGTTGATGATGTGCGAGTTGTTTTAATCAAGCTGGCAGAGTGT

Lp6 TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACAGTACGCAAACAGCTGGCAACC
13* TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACGGTACGTAACAGCTGGCAACT
6 TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACCGTACGTAACAACTGGCAACC
8 TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACCGTACGTAACAACTGGCAACT
5 TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACCGTACGTAACAACTGGCAACC
7 TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACCGTACGTAACAACTGGCAACC
10* TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACAGTACGCAAACAGCTGGCAACC
12* TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACCGTACGTAACAACTGGCAACC
Lp5 TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACCGTACGTAACAACTGGCAACC
Paris TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACAGTACGCAAACAGCTGGCAACC
9* TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACAGTACGCAAACAGCTGGCAACC
11* TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACAGTACGCAAACAGCTGGCAACC
Lt* TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACAGTACGCAAACAGCTGGCAACC
4 TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACCGTACGTAACAACTGGCAACC
16 TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACAGTACGCAAACAGCTGGCAACC
Lens TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTTTCTGAAACGATACGTAACAGCTGGCAACC
Phi TTATGTATTTTAAAGAACAGCAGGGCATCTGTCTGAAACCGTACGTAACAGCTGGCAACC

Lp6 GAAGCCATGGAAATTTATGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 13* GAAGCCATGGAAATTTACGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 6 GAAGCCATGGAAATTTACGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 8 GAAGCCATGGAAATTKACGCGCCTTTAGCWAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 5 GAAGCCATGGAAATTTACGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 7 GAAGCCATGGAAATTTACGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 10* GAAGCCATGGAAATTTATGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 12* GAAGCCATGGAAATTTACGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 Lp5 GAAGCCATGGAAATTTACGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 Paris GAAGCCATGGAAATTTATGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 9* GAAGCCATGGAAATTTATGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 11* GAAGCCATGGAAATTTATGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 Lt* GAAGCCATGGAAATTTATGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 4 GAAGCCATGGAAATTTACGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 16 GAAGCCATGGAAATTTATGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 Lens GAAGCCATGGAAATTTACGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 Phi GAAGCCATGGAAATTTACGCGCCTTTAGCTAACCGCTTGGGAATAGGGGCAATCAAGTGG
 ***** * *****

Lp6 GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATACAAGGCGATTGCCAAG
 13* GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGTCATTTCATCCAGAAGAATATAAGGCGATTGCCAAG
 6 GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATATAAGGCGATTGCCAAG
 8 GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGTCATTTCATCCAGAAGAATATAAGGCGATTGCCAAG
 5 GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATATAAGGCGATTGCCAAG
 7 GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATATAAGGCGATTGCCAAG
 10* GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATATAAGGCGATTGCCAAG
 12* GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATATAAGGCGATTGCCAAG
 Lp5 GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATATAAGGCGATTGCCAAG
 Paris GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATACAAGGCGATTGCCAAG
 9* GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATACAAGGCGATTGCCAAG
 11* GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATACAAGGCGATTGCCAAG
 Lt* GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATACAAGGCGATTGCCAAG
 4 GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATATAAGGCGATTGCCAAG
 16 GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATACAAGGCGATTGCCAAG
 Lens GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATATAAGGCGATTGCCAAG
 Phi GAAATGGAAGATTTGGCTTTCCGGCATTTCATCCAGAAGAATATAAGGCGATTGCCAAG
 ***** *****

Lp6 GGCTTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 13* GGATTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 6 GGATTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 8 GGATTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 5 GGATTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 7 GGATTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 10* GGCTTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 12* GGATTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 Lp5 GGATTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 Paris GGCTTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 9* GGCTTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 11* GGCTTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 Lt* GGCTTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 4 GGATTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 16 GGCTTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 Lens GGATTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 Phi GGATTGAAGGCTAAACGATTGGAAAGGGACAGCTTTGTCAATCGCATTGTGCGAACAGCTT
 ** *****

Lp6 GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 13* GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 6 GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 8 GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 5 GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 7 GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 10* GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 12* GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 Lp5 GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 Paris GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 9* GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 11* GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 Lt* GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 4 GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 16 GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 Lens GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT
 Phi GAACATCAGATTCGAGCAACAGGAGCTCGCCACTTTGCCGTTTATGGTCGCTCAAACAT

Lp6 ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAATGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 13* ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAATGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 6 ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAACGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 8 ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAATGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 5 ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAACGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 7 ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAACGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 10* ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAATGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 12* ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAACGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 Lp5 ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAACGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 Paris ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAATGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 9* ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAATGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 11* ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAATGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 Lt* ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAATGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 4 ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAACGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 16 ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGCAAAAATGTATCATTAGACGAGATATATGAT
 Lens ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGTAAAAATGTATCATTAGACGAAATATATGAT
 Phi ATCCATAGTATTTATAAAAAGATGAAGCGTAAAAATGTATCATTAGACGAGATATATGAT

Lp6 GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTGGGTATG
 13* GCCACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTAGGCATG
 6 GCAACAGCGGTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTAGGAATG
 8 GCCACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTAGGCATG
 5 GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTAGGAATG
 7 GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTAGGAATG
 10* GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTGGGTATG
 12* GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTAGGAATG
 Lp5 GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTAGGAATG
 Paris GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTGGGTATG
 9* GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTGGGTATG
 11* GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTGGGTATG
 Lt* GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTGGGTATG
 4 GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTAGGAATG
 16 GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTGGGTATG
 Lens GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTAGGCATG
 Phi GCAACAGCGGTTTCGTATTCTGGTAGATACTGAAGCACAATGTTACGAAGTGTAGGCATG
 ** ***** **

Lp6 GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 13* GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 6 GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 8 GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 5 GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 7 GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 10* GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 12* GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 Lp5 GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 Paris GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 9* GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 11* GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 Lt* GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 4 GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 16 GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 Lens GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA
 Phi GTTCATACTTTGTGGAAGCAAATCCAGCAGAGTTTGATGATTACATCATCAATCCAAAA

Lp6 TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCGGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 13* TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCAGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 6 TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCAGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 8 TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCAGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 5 TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCAGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 7 TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCAGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 10* TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCGGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 12* TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCAGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 Lp5 TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCAGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 Paris TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCGGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 9* TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCGGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 11* TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCGGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 Lt* TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCGGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 4 TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCAGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 16 TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCGGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 Lens TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCAGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA
 Phi TCCAATGGCTATCAGTCTCTTCATACCGCAGTAGAGGGTCCGGAAGGAAGAGTTTTTGAA

Lp6 GTGCAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 13* GTGCAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 6 GTGCAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 8 GTGCAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 5 GTGCAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 7 GTGCAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 10* GTACAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 12* GTGCAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 Lp5 GTGCAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 Paris GTACAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 9* GTACAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 11* GTACAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 Lt* GTGCAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 4 GTGCAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 16 GTACAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 Lens GTGCAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 Phi GTGCAAATCAGAACTTTTCATATGCATGATTTAGCAGAAATGGGTGTGGCAGCCCATTGG
 ** *****

Lp6 AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGTAAAAATAGAATGGTTA
 13* AAATATAAAGAGGGTGCAGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGCAAAAATAGAATGGTTA
 6 AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGCAAAAATAGAATGGTTA
 8 AAATATAAAGAGGGTGCAGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGCAAAAATAGAATGGTTA
 5 AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGCAAAAATAGAATGGTTA
 7 AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGCAAAAATAGAATGGTTA
 10* AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGTAAAAATAGAATGGTTA
 12* AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGCAAAAATAGAATGGTTA
 Lp5 AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGCAAAAATAGAATGGTTA
 Paris AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGTAAAAATAGAATGGTTA
 9* AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGTAAAAATAGAATGGTTA
 11* AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGTAAAAATAGAATGGTTA
 Lt* AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGTAAAAATAGAATGGTTA
 4 AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGCAAAAATAGAATGGTTA
 16 AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGTAAAAATAGAATGGTTA
 Lens AAATATAAAGAGGGCGCTGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGCAAAAATAGAATGGTTA
 Phi AAATATAAAGAGGGCGCGGTATCACAAAAAGAGAGCCATGAGCGCAAAAATAGAATGGTTA
 ***** ** *****

Lp6 AGAGACGTTTTGGCATGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 13* AGAGACGTTTTGGCGTGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 6 AGAGACGTTTTGGCGTGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 8 AGAGACGTTTTGGCGTGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 5 AGAGACGTTTTGGCGTGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 7 AGAGACGTTTTGGCGTGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 10* AGAGACGTTTTGGCATGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 12* AGAGACGTTTTGGCGTGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 Lp5 AGAGACGTTTTGGCGTGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 Paris AGAGACGTTTTGGCATGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 9* AGAGACGTTTTGGCATGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 11* AGAGACGTTTTGGCATGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 Lt* AGAGACGTTTTGGCATGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 4 AGAGACGTTTTGGCGTGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 16 AGAGACGTTTTGGCGTGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 Lens AGAGACGTTTTGGCGTGGCACCAGGAAATGGCGGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 Phi AGAGACGTTTTGGCGTGGCACCAGGAAATGGCAGCTAATAAAGGTGTCGAGAAAACGTT
 ***** *****

Lp6 ACGACCGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGCGATGTGTTGGAT
 13* ACGACTGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGTGTATGTGTTGGAT
 6 ACGACTGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGTGTATGTGTTGGAT
 8 ACGACTGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGTGTATGTGTTGGAT
 5 ACGACTGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGTGTATGTGTTGGAT
 7 ACGACTGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGTGTATGTGTTGGAT
 10* ACGACCGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGCGATGTGTTGGAT
 12* ACGACTGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGTGTATGTGTTGGAT
 Lp5 ACGACTGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGCGATGTGTTGGAT
 Paris ACGACCGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGCGATGTGTTGGAT
 9* ACGACCGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGCGATGTGTTGGAT
 11* ACGACCGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGCGATGTGTTGGAT
 Lt* ACGACCGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGCGATGTGTTGGAT
 4 ACGACTGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGTGTATGTGTTGGAT
 16 ACGACCGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGCGATGTGTTGGAT
 Lens ACGACCGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGCGATGTATTTGGAT
 Phi ACGACTGAGTTTCTTGAAGACAGAGTGTATGTATTTACTCCCAGTGGCGATGTGTTGGAT
 ***** *****

Lp6 TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 13* TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 6 TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 8 TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 5 TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 7 TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 10* TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 12* TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 Lp5 TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 Paris TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 9* TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 11* TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 Lt* TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 4 TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 16 TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 Lens TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT
 Phi TTACCCCATGGGGTGACTCCTTTGGATTTTGCTTATCATGTGCATAGTAATTTGGGACAT

Lp6 CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 13* CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 6 CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 8 CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 5 CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 7 CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 10* CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 12* CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 Lp5 CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 Paris CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 9* CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 11* CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 Lt* CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 4 CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 16 CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 Lens CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA
 Phi CGTTGCCGAGGTGCCAAGGTTAATGGTCATATTGTCCCATTGACTTATCAATTGAAAACA

Lp6 GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 13* GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 6 GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 8 GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 5 GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 7 GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 10* GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 12* GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 Lp5 GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 Paris GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 9* GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 11* GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 Lt* GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 4 GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 16 GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 Lens GGAGACAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT
 Phi GGAGATAGGGTTGAAGTACTGACTGGAAAAGAAATCAAACCATCAAGGGATTGGATTAAT

Lp6 CCTCATCTGAATTATTTAAAGACCGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 13* CCTCATCTGAATTATTTAAAGACCGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 6 CCCCATCTGAATTATTTAAAGACTGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 8 CCTCATCTGAATTATTTAAAGACCGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 5 CCCCATCTGAATTATTTAAAGACTGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 7 CCCCATCTGAATTATTTAAAGACTGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 10* CCTCATCTGAATTATTTAAAGACCGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 12* CCCCATCTGAATTATTTAAAGACTGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 Lp5 CCTCATCTGAATTATTTAAAGACCGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 Paris CCTCATCTGAATTATTTAAAGACCGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 9* CCTCATCTGAATTATTTAAAGACCGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 11* CCTCATCTGAATTATTTAAAGACCGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 Lt* CCTCATCTGAATTATTTAAAGACCGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 4 CCCCATCTGAATTATTTAAAGACTGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 16 CCTCATCTGAATTATTTAAAGACCGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 Lens CCTCATCTGAATTATTTAAAGACTGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 Phi CCTCATCTGAATTATTTAAAGACCGCAAGAGCCAAGGCTAAAGTATTGCATTGGTTTAAA
 ** *****

Lp6 ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAGAAGGAATTA AAA
 13* ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAAAAGGAATTA AAA
 6 ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAAAAGGAATTA AAA
 8 ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAAAAGGAATTA AAA
 5 ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAAAAGGAATTA AAA
 7 ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAAAAGGAATTA AAA
 10* ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAGAAGGAATTA AAA
 12* ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAAAAGGAATTA AAA
 Lp5 ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAGAAGGAATTA AAA
 Paris ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAGAAGGAATTA AAA
 9* ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAGAAGGAATTA AAA
 11* ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAGAAGGAATTA AAA
 Lt* ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAGAAGGAATTA AAA
 4 ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAAAAGGAATTA AAA
 16 ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAGAAGGAATTA AAA
 Lens ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAGAAGGAATTA AAA
 Phi ATGCAAGATTATGAAGATAATGTGAGAGATGGTCGTGAGTTATTGGAGAAGGAATTA AAA
 ***** ** *****

Lp6 TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTGATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 13* TCATTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTTATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 6 TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTTATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 8 TCATTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTTATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 5 TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTTATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 7 TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTTATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 10* TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTTATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 12* TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTTATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 Lp5 TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTGATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 Paris TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTGATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 9* TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTGATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 11* TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTGATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 Lt* TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTGATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 4 TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTGATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 16 TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTGATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 Lens TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTGATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 Phi TCTTTAGGTATTAATCGGATAAACTCAATGAAGTTATTACGGCATTGAATTATAAAAAG
 ** *****

Lp6 GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 13* GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 6 GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 8 GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 5 GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 7 GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 10* GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 12* GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 Lp5 GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 Paris GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 9* GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 11* GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 Lt* GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 4 GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 16 GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 Lens GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT
 Phi GCGGATGATCTTTATGCCAGCTTGGGACGAGGTGATATTTAAAATAGGTCAGATTGTTAAT

Lp6 CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 13* CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 6 CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 8 CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 5 CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 7 CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 10* CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 12* CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 Lp5 CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 Paris CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 9* CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 11* CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 Lt* CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 4 CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 16 CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 Lens CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA
 Phi CGATTGGCACCTCCAGATACTTCAGAACAAAATTTACAGAAGTTTGTAAAGACAACAACAA

Lp6 AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 13* AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 6 AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 8 AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 5 AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 7 AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 10* AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 12* AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 Lp5 AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 Paris AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 9* AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 11* AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 Lt* AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 4 AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 16 AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 Lens AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT
 Phi AAACCAGAGGTCACAGGGAGTGATCTTCGTATTGAGGGAGTTGGGAACCTATTGACATTT

Lp6 ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCCGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
13* ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCCGGTGATGAAATAGTAGGATATATCACGATTGGA
6 ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCAGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
8 ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCCGGTGATGAAATAGTAGGATATATCACGATTGGA
5 ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCAGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
7 ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCAGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
10* ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCCGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
12* ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCAGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
Lp5 ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCAGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
Paris ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCCGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
9* ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCCGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
11* ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCCGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
Lt* ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCCGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
4 ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCAGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
16 ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCCGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
Lens ATGGCGAGATGCTGCCAACCTGTTCCAGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA
Phi ATGGCAAGATGCTGCCAACCTGTTCCCGGTGATGAAATAGTAGGATACATCACGATTGGA

Lp6 AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
13* AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
6 AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
8 AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
5 AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
7 AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
10* AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
12* AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
Lp5 AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
Paris AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
9* AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
11* AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
Lt* AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
4 AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
16 AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
Lens AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA
Phi AGGGGGGTTTCCGTTTCATCGAAAAGATTGCCTAATATTATACATGCCAGTGAAAAGCAA

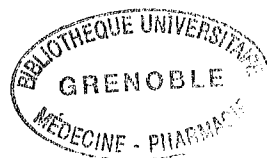
Lp6 AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
13* AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
6 AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
8 AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
5 AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
7 AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
10* AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
12* AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
Lp5 AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
Paris AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
9* AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
11* AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
Lt* AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
4 AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
16 AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
Lens AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT
Phi AAGCGACGGTTTATTTCAGGTGAATTGGGGTACAGCAACACGGGAAAATTATGTTGTTGAT

Lp6 GTGTTGATTAAGCCTTTGATCGCTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 13* GTGTTGATTAAGCCTTTGATCGCTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 6 GTGCTGATTAAGGCCTTTGATCGTTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 8 GTGTTGATTAAGCCTTTGATCGCTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 5 GTGCTGATTAAGGCCTTTGATCGTTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 7 GTGCTGATTAAGGCCTTTGATCGTTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 10* GTGTTGATTAAGCCTTTGATCGCTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 12* GTGCTGATTAAGGCCTTTGATCGTTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 Lp5 GTGCTGATTAAGGCCTTTGATCGTTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 Paris GTGCTGATTAAGGCCTTTGATCGTTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 9* GTGCTGATTAAGGCCTTTGATCGTTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 11* GTGCTGATTAAGGCCTTTGATCGTTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 Lt* GTGTTGATTAAGCCTTTGATCGCTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 4 GTGCTGATTAAGGCCTTTGATCGTTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 16 GTGCTGATTAAGGCCTTTGATCGTTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 Lens GTGCTGATTAAGGCCTTTGATCGTTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 Phi GTGTTGATTAAGCCTTTGATCGCTCCGAGTTATTGAAGGATGTTACTTCGCTGCTTTCA
 *** *****

Lp6 AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCAGAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 13* AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCAGAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 6 AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCATAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 8 AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCAGAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 5 AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCATAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 7 AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCATAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 10* AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCAGAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 12* AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCATAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 Lp5 AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCATAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 Paris AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCATAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 9* AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCATAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 11* AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCATAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 Lt* AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCAGAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 4 AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCATAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 16 AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCATAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 Lens AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCATAGCAATAAACATGAAAATATGGCT
 Phi AATGAAAAAGCCCATGTTTATGCTTTACAGACCCATAGCAATAAACATGAAAATATGGCT

Lp6 TACATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAG
 13* TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAG
 6 TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAA
 8 TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAG
 5 TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAA
 7 TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAA
 10* TACATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAG
 12* TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAA
 Lp5 TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAA
 Paris TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAG
 9* TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAG
 11* TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAG
 Lt* TACATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAG
 4 TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAA
 16 TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAG
 Lens TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAA
 Phi TATATCACTTAACTGTTGAGATCGATGGTTTAAACAGTTTGTGCGGCTTATTAACATAAA
 ** *****

Lp6 TTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
13* TTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAA
6 CTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
8 TTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAA
5 CTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
7 CTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
10* TTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
12* CTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
Lp5 CTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
Paris TTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
9* TTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
11* TTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
Lt* TTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
4 CTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
16 TTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
Lens CTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG
Phi CTGGAGCAAATTCCTAACGTGCTGGAAGCAAGAAGGCAATTATAG





Serment des Apothicaïres

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Etude du polymorphisme de séquence nucléique des gènes impliqués dans la réponse stringente chez *Legionella pneumophila*

La légionellose est une maladie infectieuse émergente dans les pays industrialisés. Elle correspond à une pneumonie contractée suite à l'inhalation d'aérosols contaminés. *Legionella pneumophila* 1 est le principal agent pathogène responsable. Ce sérotype est hétérogène sur le plan de la virulence. Aussi, il serait intéressant en matière de santé publique de pouvoir détecter les souches les plus virulentes et/ou potentiellement responsables d'épidémies.

La technique de Sequence Based Typing (SBT) se prête particulièrement à cet objectif. Plusieurs études ont déjà fait des propositions de gènes marqueurs pour séparer les souches selon leur pouvoir pathogène. Nous proposons ici d'étudier la variabilité des gènes *relA*, *rpoS* et *spoT*, impliqués dans la réponse stringente de *Legionella* nécessaire à son cycle de multiplication intracellulaire. Il s'agit d'évaluer leur valeur en tant que marqueur de virulence et/ou épidémiologique en utilisant une technique de typage par SBT.

RelA, *RpoS* et *spoT* sont étudiés chez *L. pneumophila* Paris, Lens et Philadelphia. *RelA* est séquencé chez 14 souches supplémentaires. Les trois gènes présentent une forte conservation de leur séquence. *RelA* permet de distinguer huit allèles pour 17 souches testées. Ces allèles sont corrélés aux pulsotypes définis antérieurement par PFGE (le pulsotype Paris notamment) mais ne permettent pas de séparer les isolats en fonction des deux critères étudiés : source de la souche, clinique ou environnementale et profil épidémiologique, sporadique, épidémique ou endémique. Des travaux préliminaires ont été menés sur le modèle cellulaire THP-1 de façon à caractériser la virulence intrinsèque des souches sélectionnées.

Il ressort de ce travail que *relA* possède un pouvoir discriminant intéressant en SBT puisqu'il permet de distinguer huit allèles au sein de 17 souches tout en respectant les pulsotypes. Toutefois, la mise en place d'un modèle permettant la caractérisation phénotypique des souches sur le plan de la virulence, tel que le modèle de co-culture macrophagique, nous semble nécessaire à la validation d'un marqueur génotypique de virulence.

Mots clefs : *Legionella pneumophila*, réponse stringente, *relA*, variabilité génétique, virulence

Auteur : Marion LEVAST, 32 rue Jean Jaurès, 38420 Domène