



HAL
open science

**Suivi de l'état viable non cultivable de souches de
Legionella pneumophila soumises à différents stress
(thermique ou chloré) : Evaluation de leur pouvoir
pathogène**

Thibaut Epalle

► **To cite this version:**

Thibaut Epalle. Suivi de l'état viable non cultivable de souches de Legionella pneumophila soumises à différents stress (thermique ou chloré) : Evaluation de leur pouvoir pathogène. Microbiologie et Parasitologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2015. Français. NNT : 2015STET001T . tel-01439560

HAL Id: tel-01439560

<https://theses.hal.science/tel-01439560>

Submitted on 18 Jan 2017

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.

THESE DE L'UNIVERSITE JEAN MONNET DE ST ETIENNE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR en Biologie moléculaire et cellulaire
Diplôme National-Arrêté du 7 Aout 2006

Ecole Doctorale : **Science Ingénierie Santé (SIS 488)**

Présentée par
Thibaut EPALLE

**SUIVI DE L'ETAT VIABLE NON CULTIVABLE
DE SOUCHES DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*
SOUMISES A DIFFERENTS STRESS
(THERMIQUE OU CHLORE). EVALUATION DE
LEUR POUVOIR PATHOGENE.**

Directeur de Thèse : M^r Serge RIFFARD, PU
Co-directrice de Thèse : M^{me} Françoise GIRARDOT, MCU

Soutenue publiquement le 9 Février 2015
Devant la commission d'examen composée de :

Rapporteurs : M^{me} **Sophie JARRAUD**, MCU-PH, HDR, Université de Lyon
M^r **Dominique FONTVIEILLE**, PU, Université de Savoie

Examineurs : M^r **Michel PELANDAKIS**, MCU, Université de Lyon
M^{me} **Françoise GIRARDOT**, MCU, Université de Saint Etienne
M^r **Serge RIFFARD**, PU, Université de Saint Etienne

Président : M^r **Olivier GARRAUD**, PU-PH, Université de Saint Etienne

A mes enfants...

A mon coeur ...

A mes parents...

REMECIEMENTS

Je souhaiterais, tout d'abord, remercier l'ensemble des membres du jury, les professeurs Sophie JARRAUD, Dominique FONTVIEILLE et Olivier GARRAUD ainsi que le Docteur Michel PELANDAKIS pour avoir accepté et pris le temps de juger ce travail. Je remercie vivement le Professeur Bruno POZZETTO, directeur du GIMAP, pour m'avoir permis d'effectuer ce travail de thèse au sein du laboratoire. Je tiens également à remercier mon comité de thèse qui a toujours été de bons conseils.

Toute ma gratitude va à mon directeur de thèse, le Professeur Serge RIFFARD ainsi qu'à ma co-directrice le Docteur Françoise GIRARDOT pour leur soutien, leur disponibilité et leur aide précieuse pour la valorisation de mes travaux.

Je tiens à remercier également Séverine d'avoir pris le temps de me faire découvrir l'univers de la légionelle ainsi que pour tous ses conseils.

Une pensée particulière pour « la famille Cognasse » et les bons moments passés dans le bureau du fond. Merci Hind et Fabrice pour votre soutien, votre bonne humeur et vos conseils.

Olivier, je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir toujours encouragé et soutenu aussi bien personnellement que professionnellement. Pour toutes ces discussions scientifiques ou non lors de nos pauses.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à l'ensemble des membres du GIMAP, que j'ai pu côtoyer au cours de ces quelques années. Je ne peux les nommer tous (je m'en excuse d'avance) mais je pense notamment à Amélie, Marie-Ange, Delphine, Pauline, Kim-Anh, Blandine, Fabienne, Agathe, Julie, Dejla, Adrien, Alex, Charles-Antoine, Nico, Fahd, Julien, Benjamin, Stéphane, Thomas..... Merci à tous pour vos conseils et votre bonne humeur. Les pauses café étaient un plaisir toujours agrémenté de bons mots...

Le GIMAP c'est un peu une famille et c'est avec beaucoup de bonheur (et quelques angoisses) que j'ai partagé avec vous la naissance de mes deux petites merveilles. Merci de votre soutien.

Je remercie Corinne VIGIER pour son aide, sa bonne humeur et sa réactivité pour la fabrication des milieux de culture.

Je remercie également le Docteur Alain GUIGNANDON et Norbert LAROCHE du laboratoire LBTO pour les essais de vidéomicroscopie.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer sur les projets biocapteurs, Stéphanie, Florence, Mina, Yves, Olivier P, Frédéric, Claude, Laurent....

Un petit mot également pour la région Rhône-Alpes, plus particulièrement l'ARC environnement, pour leur soutien financier pour mon allocation doctorale de recherche.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, à commencer par mes deux Loulous quel bonheur de vous avoir. Merci à toi mon cœur pour ton soutien, tes encouragements, ta patience, tes bons petits plats mais surtout ton amour....

Les derniers remerciements iront à mes parents et ma sœur sans qui je ne serais pas ici aujourd'hui. Merci à eux de m'avoir toujours suivi, encouragé et d'avoir toujours cru en moi.

SOMMAIRE

LISTES DES FIGURES	8
LISTE DES ABREVIATIONS	10
I. INTRODUCTION GENERALE.....	12
II. BIBLIOGRAPHIE.....	15
1. <i>LEGIONELLA</i>	16
1.1 Historique.....	16
1.2 La légionellose	17
1.3 <i>Legionella</i>	23
2. « L'ENVIRONNEMENT » DE LA LEGIONELLE.....	25
2.1 Ecologie des Légionelles.....	25
2.2 « Contrôle » de la légionelle	27
3. ETAT VIABLE NON CULTIVABLE (VBNC)	35
3.1 Définition (s) de l'état VBNC.....	35
3.2 Les facteurs d'inductions de l'état VBNC	38
3.3 Les facteurs de revivification.....	39
3.4 Méthodes de détection des formes VBNC.....	42
3.5 Marqueurs protéiques de l'état VBNC chez <i>L. pneumophila</i>	44
4. PLAN DES EXPERIENCES	45
III. MATERIELS ET METHODES	47
1. LES CELLULES ET LEURS CONDITIONS DE CULTURE.....	48
1.1 <i>Legionella pneumophila</i> sg 1	48
1.2 <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	48
1.3 Les lignées cellulaires	49
2. TRAITEMENT DES SOUCHES DE LEGIONELLES	50

2.1	Choc thermique	50
2.2	Dioxyde de chlore	50
3.	ETUDE DE VIABILITE DES LEGIONELLES	51
3.1	Détermination de la cultivabilité des légionelles par dénombrement sur milieu de culture BCYE	51
3.2	Etude de l'état physiologique des légionelles par cytométrie en flux.....	51
4.	EXPERIENCES DE CO-CULTURE DE LEGIONELLES SUR TAPIS CELLULAIRE	52
4.1	Co-culture <i>Legionella-Acantamoeba polyphaga</i>	52
4.2	Co-culture <i>Legionella</i> -Macrophage-like ou cellules épithéliales	52
4.3	Analyse des légionelles après co-culture <i>Acantamoeba polyphaga</i>	52
4.4	Expériences de co culture de légionelles passées sur amibes –macrophages ou amibes-cellules épithéliales alvéolaires	53
4.5	Suivi des cultures par microscopie et vidéomicroscopie à fluorescence	54
IV.	RESULTATS	55
1.	TRAITEMENT THERMIQUE.....	56
1.1	Culture sur BCYE et états physiologiques des bactéries	56
1.2	Co-culture <i>Legionella</i> -Macrophage-like ou cellules épithéliales	60
1.3	Co-culture <i>Legionella-Acantamoeba polyphaga</i>	61
1.4	Co-culture de légionelles passées sur amibes –macrophages et amibes-cellules épithéliales.....	63
2.	TRAITEMENT AU DIOXYDE DE CHLORE.....	65
2.1	Culture et état physiologique	65
2.2	Co-culture <i>Legionella- Acantamoeba polyphaga</i>	69
2.3	Co-culture <i>Legionella</i> -Macrophage-like ou cellules épithéliales	70
V.	DISCUSSION ET CONCLUSIONS	72
VI.	TRAVAUX COMPLEMENTAIRES.....	78

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	81
VIII. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	96

LISTES DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Cycle de vie de <i>L. pneumophila</i>	19
<u>Figure 2</u> : Schéma de transition entre la phase répliquative et la phase de transmission.....	20
<u>Figure 3</u> : Schéma illustrant les mécanismes de survie employés par <i>L. pneumophila</i> lors de sa phagocytose.....	22
<u>Figure 4</u> : Cycle de vie d'un biofilm.....	33
<u>Figure 5</u> : Schéma des différents facteurs pouvant intervenir dans la colonisation d'un biofilm par <i>L. pneumophila</i>	34
<u>Figure 6</u> : Schéma récapitulatif des expériences de cultures sur cellules avec les souches de <i>L. pneumophila</i> traitées ou non par différents stress.....	54
<u>Figure 7</u> : Analyse cinétique par cytométrie en flux des formes physiologiques de Lp1 RNN- après des traitements de choc thermique à 70 ° C de 0 à 60 min.....	57
<u>Figure 8</u> : Répartition des cellules viables cultivables (VC), cellules viables non cultivables (VBNC) et les cellules mortes (DC) observées après des traitements de choc thermique. ..	58
<u>Figure 9</u> : Co-culture des macrophages-like (cellules U937 différenciées) avec la souche Lp1-008, contenant le plasmide GFP (MOI 1).....	60
<u>Figure 10</u> : Suivi par vidéo microscopie de l'infection de <i>A. polyphaga</i> par la souche Lp1-008 contenant le plasmide GFP.....	62
<u>Figure 11</u> : Colonies dénombrées sur milieux BCYE après co-culture de <i>L. pneumophila</i> VBNC (traitement de 30 min à 70°C) et <i>A. polyphaga</i>	63
<u>Figure 12</u> : Evaluation de l'état viable cultivable d'une suspension de Lp1-RNN par cytométrie en flux. A : après un choc thermique. B : après un choc thermique puis co-culture sur tapis d'amibes. C : après un choc thermique suivi d'une co-culture sur tapis d'amibes puis d'une co-culture avec des macrophages-like.....	64
<u>Figure 13</u> : Analyse par cytométrie en flux des formes physiologiques de Lp1-008, Lp1-044 et Lp1-RNN après des traitements au dioxyde de chlore de 0, 4, 6, 7 mg/L pendant 60 min à température ambiante.....	66
<u>Figure 14</u> : Répartition des cellules viables cultivables (VC), cellules viables non cultivables (VBNC) et les cellules mortes (DC) observées après des traitements de choc au dioxyde de chlore à 0, 4, 6 et 7 mg/L pendant 60 min à température ambiante.....	68
<u>Figure 15</u> : Colonies dénombrées sur milieux BCYE après co-culture de 4 jours à 30°C de <i>L. pneumophila</i> et <i>A. polyphaga</i> (MOI 10).....	70

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Avantages et inconvénients des méthodes alternatives de contrôles des <i>Legionella</i> dans les systèmes d'eau et dans les tours aéro-réfrigérantes.....	32
<u>Tableau 2</u> : Agents pathogènes pour l'Homme capables d'entrer dans un état VBNC.....	41
<u>Tableau 3</u> : Etat récapitulatif de différentes conditions induisant l'état VBNC chez <i>L. pneumophila</i>	42

LISTE DES ABREVIATIONS

A549 : Cellule épithéliale alvéolaire basale humaine

ACES : N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFNOR: Association Française de Normalisation

BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract

Caco-2 : Heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells

CAP : Competence and adherence associated pili

CHO : Chinese Hamster Ovary Cell

Cl⁻ : Ion chlorure

ClO⁻ : Ion hypochlorite

ClO₂ : Dioxyde de chlore

CNRL : Centre National de Référence des Légionelles

CSTB : Centre Scientifique et Technique du Bâtiment

DC : Cellules mortes

DGGE : Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant

DGS : Direction Générale de la Santé

DMSO : Diméthylsulfoxyde

D.O : Densité Optique

DVC : Direct Viable Count

ECS : Eau Chaude Sanitaire

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique acid

EMA : Ethidium MonoAzide

GFP : Green Fluorescent Protein

GVPC : Gélose Vancomycine Polymyxine Cycloheximide

HCSP : Haut Conseil de la Santé Publique

HeLa : Henrietta Lacks

HOCl : Acide hypochloreux

HL-60 : Human promyelocytic leukemia cells

HT29 : Human colorectal adenocarcinoma cell line

INVS : Institut National de Veille Sanitaire
INF : Interféron
IP : Iodure de Propidium
JORF : Journal Officiel République Française
LCV : *Legionella* Containing Vacuole
LLAP : *Legionella* Like Amoebal Pathogens
Lp : *Legionella pneumophila*
MM6 : Mono Mac 6
MOI : Multiplicity of Infection
NH₂Cl : Chloramine
NF-κB : Nuclear factor-kappa B
PAS : Pages' Amoebal Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PMA : 12-Myristate 13-Acetate Phorbol
ppGpp : 5'-diphosphate 3'-diphosphate guanosine
PYG : Peptone Yeast Glucose
Rpf : Resuscitation-Promoting Factor
Rpm : Rotation par minute
Sg : Séroroupe
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TAR : Tours Aéro-Réfrigérantes
TNF : Tumor Necrosis Factor
U937 : Human, Lung Morphology: Lymphoblast
UFC : Unités Formant Colonies
UG : Unité Génomique
UV: Ultra Violet
VBNC : Viable Non Cultivable
VC : Cellules viables cultivables
WHO : World Health Organisation

I. INTRODUCTION GENERALE

Les légionelles sont des bacilles à Gram négatif, retrouvés dans l'environnement, d'origine hydro-tellurique pouvant provoquer deux types de maladies : (i) la maladie du légionnaire, une pneumopathie sévère, et (ii) la fièvre de Pontiac, une maladie semblable à la grippe. *Legionella pneumophila* étant l'espèce pathogène dans 90% des cas (Yu et al. 2002). Les légionelles sont naturellement présentes dans les réservoirs naturels ou artificiels d'eau douce comme les réseaux d'eaux chaudes sanitaires, les tours aéro-réfrigérantes, les systèmes de climatisation où elles se multiplient à des températures comprises entre 25 et 45°C.

La présence de cette bactérie pathogène pour l'Homme requiert une décontamination des réseaux d'eaux chaudes sanitaires. En France, les méthodes utilisées à ces fins (selon les recommandations définies par La Direction Générale de la Santé) (DGS 2002) sont le choc thermique et le choc chloré. Ces méthodes sont mises en place lorsque le seuil de 1000 Unité Formant Colonies par litre (UFC/L) est atteint dans les réseaux d'eaux chaudes sanitaires (250 UFC/L dans les établissements thermaux). D'autres techniques de décontamination existent utilisant d'autres agents oxydant (dioxyde de chlore, monochloramines,...), des biocides, les ultraviolets, l'ozone...(Blanc et al. 2005, Cheng et al. 2007, Kim et al. 2002).

Malgré toutes ces précautions, les réseaux sont rapidement recolonisés selon une cinétique variable, en fonction des conditions existantes au sein des réseaux considérés, après les traitements (Allegra et al. 2011b). De plus les études ont montré que les souches qui recolonisent les réseaux sont bien souvent les mêmes que celles présentes avant les traitements. Ce qui laisse supposer que les méthodes de désinfection n'ont pas permis d'éradiquer totalement la source de la contamination (Steinert et al. 1998). Cette recolonisation rapide peut s'expliquer par :

- la présence de biofilms (Murga et al. 2001), structures résultant de l'agglomération de nombreux microorganismes qui vont former, entre autre, une barrière protectrice contre les agressions extérieures mais qui vont permettre aussi de former un environnement confiné pouvant favoriser l'interaction entre les différents éléments constituant le biofilm comme par exemple entre les légionelles et les amibes.

- la présence de protistes, dont les amibes, lesquelles sont capables de résister aux traitements de désinfection employés (notamment pour certaines en produisant des kystes) (Scheid 2014). Les légionelles (toutes les espèces de légionelles n'infectent pas toutes les espèces de protozoaires) vont ainsi infecter les formes végétatives de protozoaires, survivre et se multiplier avant de les lyser et d'être libérées dans l'environnement. Certaines espèces sont même capables de résister dans les kystes d'amibes (Bouyer et al. 2007). Enfin, leur expulsion

depuis les formes végétatives d'amibes est possible dans des vésicules de taille respirable (Berk et al. 1998).

- la capacité des légionelles d'entrer dans un état Viable Non Cultivable (VBNC) suite à un stress. Ces bactéries deviennent alors incapables de croître sur milieux de culture standards mais conservent une activité métabolique (Oliver 2005). Le retour à des conditions favorables (température, pH, nutriments,...) et/ou la présence d'amibes vont parfois permettre à ces légionelles VBNC d'être « revivifiées » et de re-cultiver sur milieux de culture (Ducret et al. 2014, Steinert et al. 1997).

L'existence de formes VBNC n'est pas propre aux légionelles (tout du moins à *L. pneumophila* car aucune étude n'a montré l'existence de telles formes chez d'autres espèces de légionelles) (Oliver 2010). La transition vers l'état VBNC semble être (en dehors des Sporulales) largement répandue comme « outil » d'adaptation des bactéries vis à vis de différents stress.

Du fait que les bactéries se trouvent à l'état naturel, la plupart du temps, dans des environnements où différents stress s'expriment de façon permanente, il nous a semblé opportun de vérifier, pour l'espèce *Legionella pneumophila*, les profils physiologiques de trois souches soumises à deux des traitements imposés par la réglementation (WHO 1999).

Les traitements ainsi testés ont été :

- un choc thermique de 30 min à 70°C ainsi que différentes autres expositions à des températures de 50 à 70°C et durées d'exposition de 5 à 60 min ;
- un choc chloré au dioxyde de chlore (l'impact d'autres dérivés chlorés ayant déjà été documenté).

Dans un premier temps, il s'agissait donc de vérifier la proportion de formes VBNC générées consécutivement à l'utilisation de ces traitements dans les conditions du laboratoire.

Dans un second temps le but de nos travaux a été d'évaluer le pouvoir infectieux de ces formes VBNC contre des macrophages et des cellules épithéliales alvéolaires en essayant ainsi de se rapprocher des conditions d'infection au niveau de la muqueuse respiratoire.

II. BIBLIOGRAPHIE

1. LEGIONELLA

1.1 Historique

En 1976 une maladie d'origine inconnue, provoquant une pneumopathie sévère, a entraîné le décès de plusieurs vétérans de l'American Legion venus assister à un congrès dans un hôtel de Philadelphie (USA) (Fraser et al. 1977).

Le germe responsable de cette épidémie a été identifié en 1977 par Mc Dade et son équipe comme étant une bactérie. Compte tenu des circonstances, elle fut alors nommée *Legionella pneumophila* et la maladie engendrée la Légionellose ou « maladie du Légionnaire » (McDade et al. 1977). La découverte de ce germe a permis l'explication de plusieurs cas survenus plusieurs années auparavant (épisode de « fièvre de Fort Bragg » et études rétrospectives) (McDade et al. 1979). De plus il est admis que les premiers isolats de légionelles ont été documentés dès la fin des années 40 lors de l'étude des rickettsies et nommées *Rickettsia-like* (Hebert et al. 1980).

En 1979, le genre *Legionella* a été établi. Il s'agit du seul genre composant la famille des *Legionellaceae*. Depuis, 53 espèces et 64 sérogroupes de légionelles ont été isolés. Les différents sérogroupes sont déterminés par l'expression, à la surface des légionelles, d'un lipopolysaccharide dont la composition, la structure et surtout la longueur des chaînes O définissent des épitopes (Ciesielski et al. 1986). Les anticorps du panel de Dresde reconnaissent ces différents épitopes (Helbig et al. 2012, Helbig et al. 1997)). *L. pneumophila* est l'espèce la plus connue. Elle est responsable de plus de 90% des cas de légionellose et plus de 84% des cas sont même occasionnés par des isolats du séro groupe 1. Ces statistiques sont évidemment associées au fait que tous les moyens de détection ont, au moins initialement, été mis au point pour cette espèce (test de détection de l'antigène urinaire par exemple). La moitié des espèces de légionelles connue à ce jour a été associée avec une infection de l'Homme (certaines avec uniquement des preuves sérologiques, les souches responsables n'ayant jamais pu être isolées).

La plupart des espèces de légionelles est considérée comme intracellulaire facultative, les bactéries étant capables au cours de leur cycle de développement d'infecter certaines espèces de protozoaires. Elles sont également connues pour coloniser / former (au moins de façon précoce comme espèce pionnière) certains biofilms (Bigot et al. 2013, Mallegol et al. 2012). Leur survie à long terme dans de tels consortia est mal documentée.

Des espèces particulières de légionelles, initialement regroupées sous le terme « LLAPs » (*Legionella Like Amoebal Pathogens*), ont été rattachées au genre *Legionella*. Ces

bactéries se développent uniquement en présence d'amibes en provoquant leur lyse. Parmi ces « LLAPs », *Legionella drozanskii*, *Legionella rowbothamii*, *Legionella fallonii* et *Legionella drancourtii* ont été caractérisées comme des pathogènes strictement intracellulaires (Adeleke et al. 2001, La Scola et al. 2004). D'autres LLAPs évoquées dans la littérature n'ont jamais fait l'objet d'une procédure d'identification complète suggérant la présence d'autres espèces intracellulaires obligatoires (donc non détectées par les normes de détection impliquant la culture) dans l'environnement ou susceptibles de contaminer l'Homme. Dans ce contexte, il a été démontré que plusieurs « LLAPs » ont été responsables, par le passé (au cours d'études sérologiques rétrospectives conduites en particulier par le « Center for Diseases Control » d'Atlanta (USA)), de cas de légionellose (Adeleke et al. 1996, McNally et al. 2000).

Enfin, une espèce de légionelle (*L. jeonii*) endosymbiotique d'une amibe, *Amoeba proteus*, a été décrite suggérant la possibilité que certaines espèces peuvent se maintenir dans l'environnement autrement que par un comportement de type parasite (Park et al. 2004).

1.2 La légionellose

La plupart des espèces de légionelles est reconnue comme étant pathogène pour l'Homme et leur transmission jusqu'à la muqueuse respiratoire s'effectue par des aérosols de taille respirable (Bollin et al. 1985).

En France, la légionellose est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1987. Chaque cas doit donc être déclaré aux autorités compétentes à savoir aux Agences Régionales de Santé (ARS) qui en informeront l'Institut de Veille Sanitaire après validation des informations. De plus un réseau de surveillance européen - « l'European Legionnaires Disease Surveillance Network » - comprenant les états membres de l'Union Européenne ainsi que l'Islande et la Norvège recense les cas liés au voyage. La mise en place de ces mesures permet ainsi d'avoir une « cartographie » des cas de légionellose.

Afin de connaître l'évolution de la maladie à travers les années, l'Institut de Veille Sanitaire édite un bilan annuel des cas de légionellose recensés en France. De plus le haut conseil de santé publique édite un guide d'investigation et d'aide à la gestion qui regroupe différents critères tels que les données cliniques, les résultats bactériologiques, les facteurs de risque individuels et les sources d'expositions (Campèse et al. 2005). L'Institut de Veille Sanitaire a recensé 1262 cas en 2013 et 226 cas de légionellose de janvier à avril 2014 en France (INVS 2014).

Les risques individuels de contracter la maladie après avoir été exposé à de l'eau contaminée dépendent de plusieurs facteurs. Les personnes immunodéprimées ou ayant subi une greffe et plus généralement les personnes ayant un système immunitaire affaibli sont considérées à risques élevés.

D'autres facteurs sont également associés à la maladie tels que :

- l'âge, le risque augmentant à partir de 50 ans (de rare cas avant 20 ans ont été diagnostiqués) ;
- le sexe (les hommes sont majoritairement atteints) ;
- le tabagisme ;
- les pathologies chroniques pulmonaires, cardiaques ou l'insuffisance rénale ;
- les antécédents d'une intervention chirurgicale récente (HCSP 2013).

Cependant un certain nombre de cas (17 %) concerne des sujets sains. A ce jour, aucune transmission interhumaine n'a été rapportée.

La maladie provoquée peut être de trois types :

- La fièvre de Pontiac : maladie bénigne, pseudo-grippale, guérissant spontanément entre 2 et 5 jours.
- La Légionellose : maladie grave observée après une période d'incubation de 2 à 10 jours. Elle se manifeste par des pneumopathies. Les premiers symptômes ressemblent à une grippe, la fièvre augmente puis surviennent des sensations de malaise, ainsi que des douleurs abdominales. La maladie peut évoluer vers une insuffisance respiratoire irréversible et une insuffisance rénale aiguë. Le traitement par des antibiotiques reste le moyen le plus efficace de neutraliser la maladie dans 80% des cas.
- Les formes extra-pulmonaires : exceptionnelles, le cœur est le site extra-pulmonaire le plus fréquemment touché avec des manifestations sous forme de myocardite, péricardite ou endocardite sur valve prothétique (Gowani et al. 2013).

Les deux méthodes essentielles au diagnostic des légionelles sont la recherche d'antigènes urinaires de *L. pneumophila* (dépistage rapide et précoce) (Birtles et al. 1990, Blazquez et al. 2005, Kashuba and Ballow 1996, Shimada et al. 2009) et la mise en culture de prélèvements pulmonaires pour isoler et identifier la souche (Fields et al. 2002). Les lieux les plus propices à la dissémination de la légionelle sont les réseaux d'eau collectifs des hôtels, des hôpitaux ou des stations thermales ainsi que les tours aéro-réfrigérantes (TAR).

- Cycle de vie de *Legionella pneumophila*

Les *Legionella* (tout du moins *L. pneumophila*) qui transitent entre des cellules hôtes (protozoaires) et l'environnement ont un cycle de vie biphasique caractérisé par l'alternance entre une forme répliquative et une forme infectieuse. Ces deux phases ont été décrites par Molofsky et Swanson (Figure 1) et sont observées au cours de l'infection des macrophages et des amibes (Molofsky and Swanson 2004) :

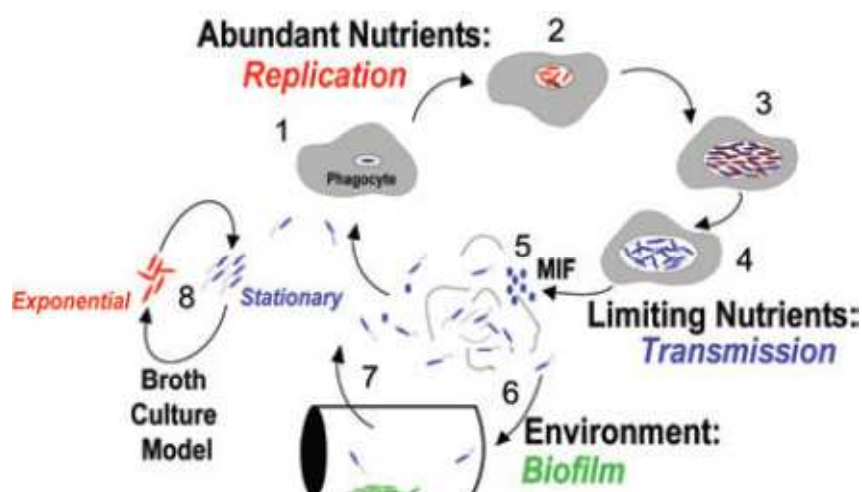


Figure 1 : Cycle de vie de *L. pneumophila* (Molofsky and Swanson 2004).

- la phase de répliquative : se déroule lorsque les conditions sont favorables. La bactérie se multiplie et les gènes de virulence sont faiblement exprimés. La bactérie est immobile.

- la phase de transmission est liée à l'appauvrissement en nutriments du milieu. La bactérie stoppe sa répliquative et passe sous sa forme transmissible aux amibes et macrophages. Cette transmission semble dépendre de l'expression de plusieurs gènes (Figure 2) (Hammer et al. 2002).

La légionelle va donc être constamment « en équilibre » entre ces deux phases ceci en fonction des signaux environnementaux perçus lesquels induisent la régulation de plusieurs gènes (Albert-Weissenberger et al. 2007).

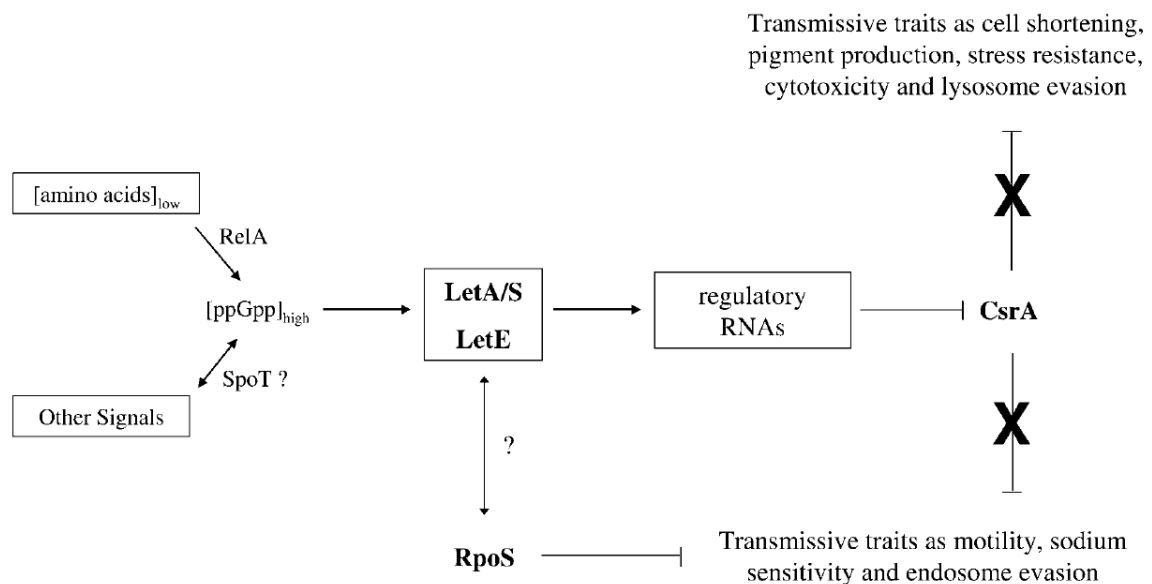


Figure 2 : Schéma de transition entre la phase répllicative et la phase de transmission (Albert-Weissenberger et al. 2007).

Ce modèle montre quelques facteurs impliqués lors de la transition entre la phase de réplication et la phase de transmission suite à la privation en nutriments. La diminution de la concentration en acides aminés va entraîner la production de ppGpp (5'-diphosphate 3'-diphosphate guanosine) en forte concentration. Ce niveau élevé en ppGpp conduit probablement à la transcription d'ARN régulateurs, sous la dépendance du système LetA/S. Ces ARNs vont ainsi inhiber l'activité CsrA ce qui a pour effet d'activer le passage en phase de transmission. En outre RpoS semble impliqué dans l'expression de certains signaux qui répriment l'entrée en phase de transmission.

- Pouvoir pathogène des légionelles

La légionelle se transmet à l'homme par l'intermédiaire d'aérosols contaminés. Ainsi la bactérie va pénétrer dans le système respiratoire où les mécanismes de défense vont être mis en place avec comme acteurs principaux les monocytes et macrophages. Les lignées cellulaires de type macrophage telles que les cellules dérivées des promyélocytes, HL-60 (Marra et al. 1990), ou les lignées de monocytes, U937 (Pearlman et al. 1988), ont été décrites comme étant de bon modèles pour l'étude des interactions entre les cellules humaines et la légionelle. Toutefois une différenciation par des agents chimiques (phorbol par exemple) de ces monocytes en macrophages est nécessaire. D'autres types de lignées cellulaires peuvent être utilisés comme les Mono Mac 6 (MM6) issues de sang périphérique de patient atteint de leucémie. Ces cellules MM6 possèdent la particularité d'exprimer un phénotype de

macrophage plus mature sans subir de différenciation préalable (Neumeister 2004). Les cellules épithéliales alvéolaires peuvent aussi être mises à contribution lors d'une infection et un des modèles pour comprendre les mécanismes de réplication des légionelles est la lignée A549 (Maruta et al. 1998). Ce mécanisme se déroule en 4 étapes, durant la première étape, *L. pneumophila* inhibe la fusion des lysosomes avec le phagosome dans lequel elle est installée. Ce processus requiert les protéines produites par le système de sécrétion de type IV Dot/Icm. La deuxième étape voit l'attachement de vésicules du réticulum endoplasmique rugueux (RER) à la membrane du phagosome. Cette étape est également médiée par le système de sécrétion Dot/Icm, plus précisément par des protéines injectées dans le phagosome par *L. pneumophila*. Pendant la troisième phase, la membrane du phagosome devient plus fine, puis la quatrième phase est caractérisée par l'attachement de ribosomes à la surface du nouveau phagosome. *L. pneumophila* va induire une modification de la membrane du phagosome, pour mimer la membrane du réticulum endoplasmique et modifier un processus cellulaire normal afin de se protéger de la protéolyse (Tilney et al. 2001).

Les différentes études menées sur la réplication de la légionelle (tout du moins *L. pneumophila*) au sein des cellules montrent que celle-ci va inhiber la fusion phagosome-lysosome en formant une vacuole, *Legionella* Containing Vacuole (LCV), entraînant une cascade de réactions mettant en jeu différents facteurs tels que les caspases, la voie NF-kB, les cytokines...(Figure 3) (Khweek and Amer 2010).

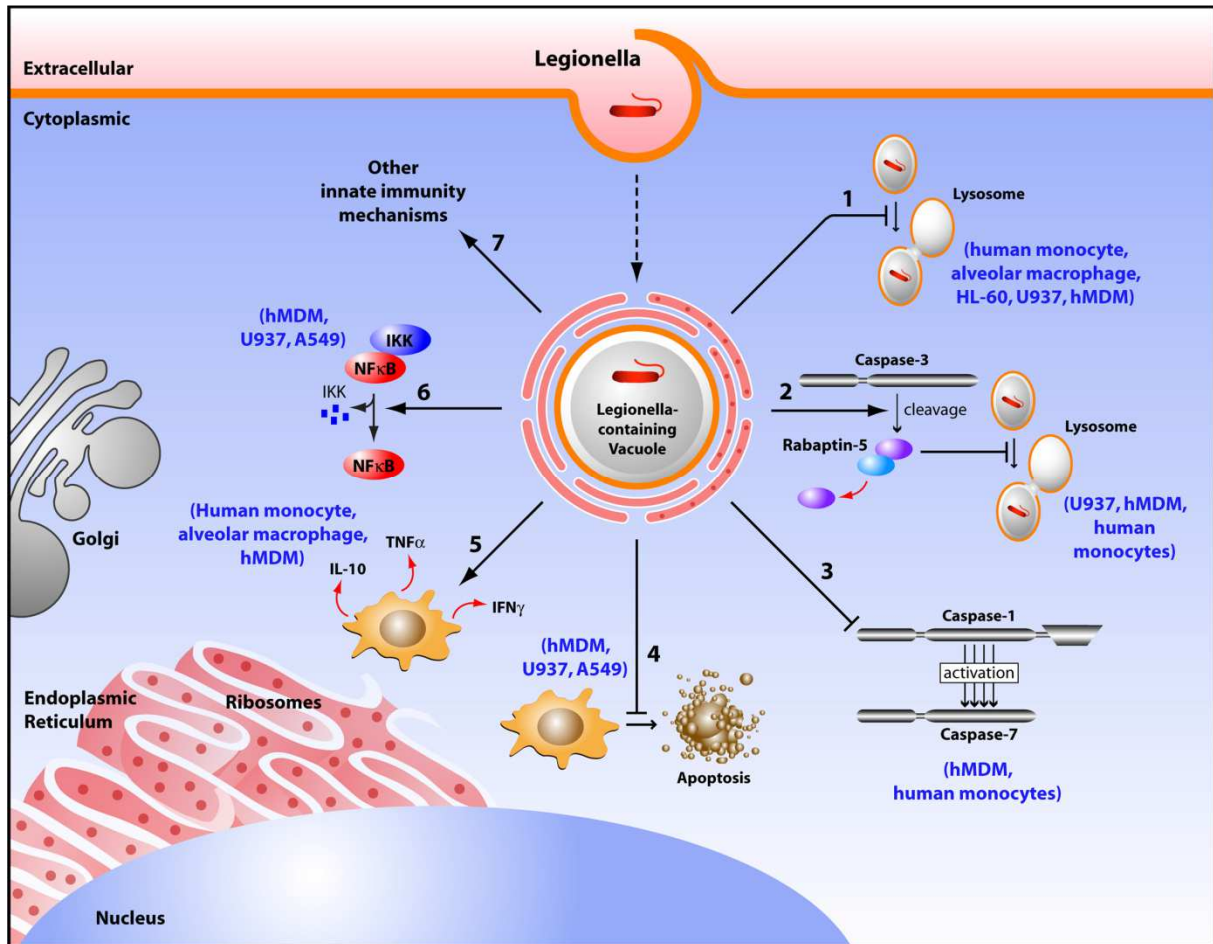


Figure 3 : Schéma illustrant les mécanismes de l'immunité innée employés par *L. pneumophila* lors de sa phagocytose (Khweek and Amer 2010).

Lors du processus d'infection cellulaire, *L. pneumophila* va donc former une vacuole LCV, qui évite la fusion typique avec le lysosome, et va recruter des vésicules du réticulum endoplasmique pour permettre la réplication bactérienne (1). *L. pneumophila* va favoriser le clivage de Rabaptin-5 par la caspase-3 (2), et inhiber les caspases-1 et 7 (3) ce qui empêche la fusion phagosome-lysosome. De plus elle va stopper l'apoptose de la cellule hôte par des gènes de régulation anti-apoptotiques (4). La bactérie va contrôler la production de cytokines activatrices (TNF- γ , TNF- α) et des cytokines inhibitrices (IL-10) (5). Le traitement de l'IL-10 augmente de manière significative la croissance de *L. pneumophila* dans les monocytes, et inverse complètement l'effet protecteur de l'TNF- γ sur la réplication de *L. pneumophila*. L'équilibre local entre TNF- γ et la production d'IL-10 par *L.pneumophila* peut déterminer si les monocytes qui sont recrutés au site de l'infection deviendront des cellules effectrices des cibles disponibles pour la croissance bactérienne. L'activation de la voie des NF- κ B va alors permettre à la cellule hôte de se maintenir en vie (6). Enfin *L. pneumophila* va moduler d'autres réponses immunitaires innées pour établir une niche répliative (7).

Pour établir une infection intracellulaire les bactéries pathogènes doivent bouleverser les échanges métaboliques et échapper à la réponse immunitaire de la cellule infectée. Elles utilisent des appareils de sécrétion, des composants macromoléculaires qui sont localisés à la surface de la bactérie et dont certains sont sécrétés dans la cellule cible et agissent comme effecteurs.

Deux systèmes de sécrétion ont été décrits comme impliqués dans l'infectivité de *L. pneumophila* : le système de sécrétion de type II PilD dépendant et le système de sécrétion de type IV codé par les gènes *dot/icm* (De Buck et al. 2007).

L'appareil de sécrétion de type II a été décrit suite à la découverte de la préiline peptidase PilD. Cette protéine PilD est impliquée dans la biogénèse et l'assemblage des pili de type IV permettant l'adhésion à l'hôte cellulaire et aux biofilms. Attachée à la membrane cytoplasmique, elle est, de plus, directement engagée dans le développement de l'appareil de sécrétion de type II par mobilisation et assemblage de pseudopilines.

Le système de sécrétion de type IV est codé par les gènes *dot* (defective organelle trafficking) ou *icm* (intracellular multiplication), au nombre de 25 et situés en deux régions séparées du chromosome. La plupart de ces gènes codent des protéines membranaires, composants structuraux du système de sécrétion. Les gènes *icmS*, *-R*, *-Q* et *-W* codent des protéines cytoplasmiques qui auraient des propriétés de protéines chaperonnes jouant un rôle dans le transfert d'effecteurs *via* le système de sécrétion. Certains de ces effecteurs comme RalF, LidA, SidC, LepA et LepB ont été identifiés comme étant exportés dans la cellule hôte (Abu-Zant et al. 2005).

1.3 *Legionella*

- Morphologie, croissance, culture

Les légionelles sont des bacilles aérobies à Gram négatif, non sporulées. Elles sont mobiles car dotées d'un ou plusieurs flagelles en position polaire ou latérale. *L. longbeachae* apparaît comme une exception puisqu'elle possède des gènes codant pour la synthèse d'une capsule et n'est pas mobile (Cazalet et al. 2010). Leur taille varie de 0,2 à 0,9 µm de large sur 2 à 20 µm de long et leur forme de coccobacilles *in vivo* tend vers des formes plus allongées lorsqu'elles sont cultivées en laboratoire. Les colonies cultivées sur milieu solide sont de

forme circulaire présentant un aspect de verre fritté et de couleur grisâtre lorsqu'elles sont observées à la loupe binoculaire.

Ces microorganismes sont organotrophes et utilisent le carbone et des acides aminés comme source d'énergie. Elles sont en revanche incapables de synthétiser la L-cystéine, de réduire les nitrates ou de fermenter le glucose (Fliermans 1996). Un apport en fer, un milieu tamponné à pH 6,9 ainsi qu'une température de 37°C représentent les conditions optimales de croissance et de multiplication. En revanche la présence en CO₂ ne semble pas significativement stimuler leur croissance alors que le chlorure de sodium est un inhibiteur de leur développement (Feeley et al. 1979).

La culture en milieu solide se réalise le plus souvent sur milieu BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) supplémenté en L-cystéine, en tampon ACES (N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid), en fer, additionné d'agar et de charbon (Feeley et al. 1979). D'autres milieux ont été développés, ainsi Wadowsky et Yee ont suggéré d'incorporer de la glycine, de la vancomycine et de la polymyxine B (milieu GVP) pour obtenir un milieu « sélectif » (Wadowsky and Yee 1981). Puis l'ajout de cycloheximide a permis l'obtention du milieu GVPC augmentant le taux d'isolement des légionelles. D'autres milieux « sélectifs » ont été mis au point et de récentes études ont démontré que les milieux BMPA (milieu BCYE supplémenté par du céfamandole, de la polymyxine B et de l'anisomycine) et MWY (milieu BCYE additionné de glycine, de vancomycine, polymyxine B et d'anisomycine) permettaient un meilleur isolement pour des échantillons contenant un faible inoculum de *Legionella* que les milieux BCYE et GVPC (Descours et al. 2014).

Les amibes, de par leur capacité à revivifier les légionelles, peuvent aussi être utilisées comme milieu culture grâce aux techniques de co-culture. Elles consistent en l'utilisation d'amibes comme cellules hôtes afin d'isoler les bactéries intracellulaires à partir d'échantillons provenant de différents prélèvements (environnementaux ou cliniques) (Pagnier et al. 2014, Pagnier et al. 2008, Rowbotham 1980, Tosetti et al. 2014). Cette technique a notamment permis de caractériser les formes « LLAPs » de légionelles (Adeleke et al. 2001).

Pour autant les normes de détection (AFNOR et ISO), basées sur la technique de culture, imposent l'utilisation du milieu GVPC.

2. « L'ENVIRONNEMENT » DE LA LEGIONELLE

2.1 Ecologie des Légionelles

- Leur habitat naturel

Les légionelles sont essentiellement des microorganismes aquatiques même si certaines espèces comme *L. longbeachae* sont plus fréquemment isolées à partir d'échantillons telluriques (humus, composts, terreau,..) (Koide et al. 1999, Lindsay et al. 2012, Pravinkumar et al. 2010, Steele et al. 1990). Elles sont naturellement présentes dans les lacs, les rivières (Luck et al. 2010) et les sources thermales (Fliermans 1983, Sukthana et al. 2005). D'autres études ont démontré la présence de la bactérie dans les eaux souterraines (Brooks et al. 2004, Costa et al. 2005, Riffard et al. 2001), les eaux usées, le sol (Wallis and Robinson 2005), les eaux de pluie (en faible proportion) (van Heijnsbergen et al. 2014), les aérosols d'usines de compostage ainsi que dans le terreau (Casati et al. 2010, Conza et al. 2013, Lindsay et al. 2012). La présence des légionelles a aussi été démontrée dans des milieux plus extrêmes, comme les milieux salins ou polaires, mais uniquement sous forme intracellulaire chez les amibes (Carvalho et al. 2008, Gast et al. 2011).

Mais elles ont surtout colonisé les milieux anthropiques tel que les réseaux d'eaux chaudes sanitaires, les tours aéro-réfrigérantes (Walser et al. 2014), les piscines, les fontaines décoratives (Hlady et al. 1993) ou les spas, le plus souvent associées à d'autres organismes au sein de biofilm.

- Colonisation des réseaux d'eau

Les souches de légionelles à l'origine d'infections sont rarement issues de l'environnement naturel mais proviennent majoritairement des installations « humaines ». En effet, les écosystèmes cités précédemment (réseaux sanitaires, TAR, bassins, fontaines,...) regroupent souvent plusieurs facteurs favorisant le développement de la bactérie. La température (entre 25 et 45°C), le pH (entre 5,5 et 8,5), la présence de matières organiques et inorganiques, les microorganismes, l'eau stagnante, le matériau des canalisations (Rogers et al. 1994) sont autant d'éléments aidant à la prolifération des légionelles. Tous ces paramètres favorisent le développement de biofilms dans lesquels elles peuvent éventuellement persister (Abdel-Nour et al. 2013, McCoy et al. 1981).

- Interaction avec les amibes

La légionelle est ubiquitaire dans l'environnement et ce malgré des conditions globalement défavorables à sa croissance. Afin de survivre dans des milieux le plus souvent pauvres en nutriments, *Legionella* est capable d'interagir avec d'autres microorganismes. Elle va se multiplier dans les cellules hôtes et va être protégée lorsque les conditions deviennent défavorables (température, Ultra-Violet et chlore principalement). Les légionelles sont donc difficiles à détecter dans l'environnement naturel. De ce fait des études ont montré que ces bactéries sont pléomorphes et que *L. pneumophila* suit un cycle morphologique associé à la présence de la cellule hôte (Faulkner and Garduno 2002). Les protozoaires jouant le plus souvent un rôle de réservoir à *Legionella* sont les amibes libres. En effet dès 1980, Rowbotham a montré la capacité de *L. pneumophila* à pénétrer et se multiplier au sein des amibes appartenant aux genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* (Rowbotham 1980). Depuis, de nombreuses études, réalisées à partir de réseaux contaminés, ont confirmé que 13 espèces d'amibes et 2 espèces de protozoaires ciliés pouvaient être utilisées comme « niche » de réplication par *Legionella* (Abu Kwaik et al. 1998). Généralement la légionelle est absorbée par la cellule hôte soit par « coiling phagocytosis » soit par phagocytose classique. Le contact entre les deux microorganismes semble suffisant pour activer le système de type IV Dot/Icm (Charpentier et al. 2009) et ainsi détourner les voies de signalisation de la cellule hôte. Seulement 5 minutes après l'internalisation de la bactérie, une nouvelle vacuole est formée - LCV - qui recrute les vésicules du réticulum endoplasmique, les mitochondries et les ribosomes. La bactérie peut donc ainsi commencer sa réplication et se multiplier au sein de vacuoles (Bozue and Johnson 1996) jusqu'à sa libération par lyse de la cellule hôte.

Les genres d'amibes les plus couramment associés à la croissance de *Legionella* sont *Hartmannella* et *Acanthamoeba* (Fields 1996). De nombreuses études montrent les multiples implications que peuvent avoir ces interactions telles qu'une réplication accrue, une résistance à différents stress (température, pH, biocides...), une augmentation du pouvoir infectieux (Brieland et al. 1997, Cirillo et al. 1994), la possibilité de revivification des formes VBNC de *Legionella* (Steinert et al. 1997) ainsi qu'une augmentation du nombre de légionelles au sein de vésicules respirables (Berk et al. 1998).

Les amibes semblent donc jouer un rôle majeur dans la survie, la multiplication et la dispersion des légionelles. De plus il apparaît probable que la légionelle utilise l'amibe comme « terrain d'entraînement » afin d'établir des stratégies adéquates pour infecter d'autres organismes plus évolués que sont les cellules humaines (Molmeret et al. 2005).

2.2 « Contrôle » de la légionelle

- Modalités de surveillance des réseaux et des installations

La surveillance de *Legionella* est obligatoire dans les eaux minérales à usages thérapeutiques, les TAR et les réseaux d'eaux chaudes sanitaires des établissements recevant du public (hôpitaux, hôtels, camping, résidences pour personnes âgées, etc...).

Afin de prévenir de la présence de *Legionella* des contrôles doivent être effectués en amont de la mise en service des réseaux d'eaux chaudes sanitaires et des TAR.

Le contrôle de la légionelle nécessite une surveillance régulière des installations au niveau des points d'usage à risque (sortie de la production d'eau chaude sanitaire, fond de ballon de production et stockage d'eau chaude,...). Cette surveillance est basée sur la mesure de la température de l'eau (une fois par jour, semaine ou mois en fonction des établissements ciblés) et les analyses de légionelles une fois par an (JORF 2010). Les analyses sont réalisées par des laboratoires qui ont reçu l'accréditation adéquate reposant sur la norme ISO17025.

La teneur en légionelles dans l'eau n'est pas uniquement contrôlée par la température mais d'autres paramètres doivent être surveillés pour limiter le développement et la prolifération de ces bactéries. Il apparaît nécessaire de mettre en place plusieurs suivis dont la présence de certains autres microorganismes (amibes, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), l'analyse des teneurs en éléments nutritifs (fer, carbone organique) et/ou la mesure des composés chimiques résiduels (chlore libre, silicium, par exemple). La surveillance du réseau doit être menée régulièrement afin de déceler toute anomalie de fonctionnement et de contrôler l'état des matériaux (corrosion, tartre...).

De plus des actions préventives doivent être mises en place telles que la lutte contre la corrosion et la stagnation de l'eau et le traitement en continu des réseaux par des composés chimiques.

- Méthodes de détection normalisées

Plusieurs normes visant à détecter la légionelle dans l'eau ont donc été mises en place. En France, les normes pour la détection des légionelles sont :

- La norme NF T90-431, de novembre 2014, Qualité de l'eau, « Recherche et dénombrement des *Legionella spp* et *Legionella pneumophila*- Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation ». Cette méthode consiste à dénombrer le nombre de colonies sur milieu de culture qui doit être

inférieur à 1000 Unités Formant Colonie par litre dans un réseau d'eau chaude sanitaire (mais 10 UFC/L dans établissements thermaux par exemple).

- La norme NF T90-471, d'avril 2010, Qualité de l'eau, « Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR) ».

Cette méthode se base sur la quantité d'ADN présente dans l'échantillon et se mesure en unité génomique (UG). Le seuil a été fixé à 5000 UG/L.

Si toutefois la présence de *Legionella* détectée est supérieure au seuil limite toléré par les institutions, ou si un cas de légionellose est déclaré, la désinfection du ou des réseaux contaminés est immédiatement réalisée.

- Méthodes curatives

Afin d'éradiquer la population de *Legionella*, différents traitements peuvent être utilisés en fonction des contraintes réglementaires comme le critère de potabilité de l'eau mais aussi en fonction de leur efficacité et de leur effet sur les matériaux.

Plusieurs méthodes de désinfection existent, les principales étant le traitement thermique et le traitement chloré, les filtres à eau, les ultraviolets ainsi que d'autres composés chimiques tels que le dioxyde de chlore, l'ozone et les chloramines (Orsi et al. 2014, Szabo and Minamyer 2014).

- Traitement thermique

Le traitement par l'augmentation de la température de l'eau consiste à faire circuler dans tout le réseau une eau portée à 70°C pendant 30 min. Les légionelles ne survivant pas, normalement, à cette température. Pour éviter tout risque de brûlures, la décontamination se fait généralement de nuit après informations des usagers. Cette méthode simple, rapide, facile à mettre en place est limitée par son manque d'efficacité et son action dans le temps, l'eau étant colonisée à nouveau (Allegra et al. 2011b).

- UV

Les radiations UV ont un effet bactéricide en agissant sur l'ADN provoquant des dimères de thymine et ralentissant ainsi la répllication bactérienne (Franzin et al. 2002). Cette technique consiste à exposer l'eau à traiter aux rayons UV produits par des lampes à vapeur de mercure. Son application est limitée du fait de son efficacité avérée uniquement sur les réseaux à faible débit et peu chargés en éléments en suspension. Ces particules pouvant masquer la bactérie et

la protéger des rayons UV. Par ailleurs, les U.V n'ont pas d'effets sur les biofilms situés loin des points de traitement.

- Filtration

La technique consiste à placer un filtre au point d'utilisation afin de retenir les particules présentes dans l'eau. Dans le cas de la légionelle on parle de microfiltration (Salvatorelli et al. 2005). Cette méthode est simple, facile à mettre en place et surtout utilisée dans les zones à haut risque. Le principal inconvénient vient du fait de la surveillance particulière à apporter aux filtres afin d'éviter tout colmatage. Ainsi, pour une efficacité optimale, le remplacement des filtres est nécessaire tous les 7 jours d'où un coût d'utilisation non négligeable.

- Traitements chimiques

- Le chlore

Dans l'eau le chlore libre se présente sous trois états en équilibre, l'acide hypochloreux (HOCl), l'ion hypochlorite (ClO⁻) et l'ion chlorure (Cl⁻). L'activité bactéricide est principalement due à l'acide hypochloreux dont la concentration dépend du pH et de la température. A température ambiante par exemple, l'acide hypochloreux est surtout présent pour des pH de l'eau inférieurs à 7,5.

L'utilisation de ce composé pour la désinfection des réseaux peut se faire selon deux modalités : un choc chloré ou un traitement en continu.

Selon la littérature, le traitement continu au chlore nécessiterait une concentration entre 2 et 6 mg/L de chlore (Lin et al. 1998). En France, le chlore libre en continu est utilisé à une concentration de 1 mg/L (CSTB 2012)).

Le traitement hyperchloré consiste en une injection d'une solution contenant entre 15 et 100 mg/L de chlore libre. Après un temps de contact variant en fonction de la concentration utilisée, le réseau est vidangé.

- Le dioxyde de chlore

Le dioxyde de chlore est un agent chimique qui se décompose rapidement, mais qui a l'avantage de pénétrer facilement dans le biofilm, d'être compatible avec la potabilité de l'eau et d'être, selon certains auteurs, le plus efficace des composés chimiques (Thomas et al. 2004). Pourtant des études menées au sein de réseaux de différents hôpitaux montrent des résultats différents. Dans un premier cas le traitement a été efficace et aucun cas de légionellose n'a été détecté pendant la période de traitement (Srinivasan et al. 2003). A

contrario, *Legionella* a persisté après le traitement dans un hôpital au Pays de Galles et deux cas de maladie nosocomiale ont été recensés (Hosein et al. 2005). En France, le traitement préconisé est un traitement en continu à 1 mg/L de chlore libre.

- Chloramines

L'espèce la plus utilisée est la monochloramine formée à partir d'ammoniaque et de chlore (NH_2Cl). Elle pénétrerait plus facilement à l'intérieur des biofilms, serait plus efficace envers les amibes mais son action serait plus lente que le chlore libre (Kool et al. 1999). La monochloramine va agir rapidement sur 4 acides aminés (cystéine, cystine, méthionine et tryptophane) et lentement sur l'ADN sans endommager totalement l'enveloppe cellulaire (Jakubek et al. 2013). De plus l'état physiologique des bactéries peut influencer l'efficacité de l'inactivation de l'agent l'oxydant (Ramseier et al. 2011). Cependant son mode d'action spécifique sur les bactéries n'est pas encore bien connu.

- L'ozone

Domingue et ses collaborateurs ont montré que 99% des légionelles sont tuées après 5 min d'exposition à une concentration de 0,1 à 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alors que les traitements au chlore libre ou au peroxyde d'hydrogène nécessitent des temps d'expositions et des concentrations supérieures (Domingue et al. 1988). Toutefois, l'ozone se dégrade rapidement et n'a pas d'effets durables ce qui impose une mise en œuvre complexe et un coût important.

Ces différents moyens de lutter contre la bactérie présentent chacun leurs avantages et leurs inconvénients (voir aussi Tableau 1 d'après Bartram (Bartram 2007)). Pourtant la bactérie est de nouveau détectée dans les réseaux après plusieurs semaines ou mois (Allegra et al. 2011b, Cooper et al. 2008). Une association de plusieurs traitements est souvent la meilleure alternative à la colonisation des réseaux par la légionelle (Casari et al. 2007).

Method	Advantages	Disadvantages
Keeping temperature <20 °C	<ul style="list-style-type: none"> • Simple, effective and easily monitored • Little significant growth of <i>Legionella</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Only really applicable to drinking water systems
Keeping temperature >50 °C	<ul style="list-style-type: none"> • Simple, effective and easily monitored 	<ul style="list-style-type: none"> • Does not eliminate legionellae • Requires circulation temperature to be near 60 °C • Difficult to maintain temperatures in old systems • Requires protection against scalding
Periodic flushing with hot water at 50–60 °C (usually an essential part of control by high temperature, above)	<ul style="list-style-type: none"> • Simple, effective and easy to monitor 	<ul style="list-style-type: none"> • Not applicable in cold-water systems • Requires protection against scalding • Must be maintained and inspected to achieve consistent control • Recolonization occurs within days
Dosing with sodium hypochlorite	<ul style="list-style-type: none"> • Proven, effective disinfection technique • Simple to use • Relatively cheap 	<ul style="list-style-type: none"> • Formation of trihalomethanes • Needs protection (e.g. carbon filter) for dialysis patients • Toxic to fish • Affects taste and odour • Not stable, particularly in hot water • Increases corrosion of copper
Dosing with monochloramine	<ul style="list-style-type: none"> • More persistent than chlorine • Simple to use in mains distributions • Penetrates into biofilms 	<ul style="list-style-type: none"> • Needs protection (e.g. carbon filter) for dialysis patients • Toxic to fish • Affects rubber components • No commercial kit available for dosing small water systems
Dosing with chlorine dioxide	<ul style="list-style-type: none"> • Proven disinfection technique • Simple to use 	<ul style="list-style-type: none"> • Formation of chlorite • Needs protection (e.g. carbon filter) for dialysis patients • Safety considerations (depending on method of generation)

Method	Advantages	Disadvantages
Dosing with hydrogen peroxide	<ul style="list-style-type: none"> • Simple to use 	<ul style="list-style-type: none"> • Weak disinfectant • Suspected of mutagenicity
Copper and silver ionization	<ul style="list-style-type: none"> • Effective when prescribed concentrations are maintained 	<ul style="list-style-type: none"> • Frequent monitoring of copper and silver needed • Pretreatment needed (pH, hardness) • Increased concentrations of copper and silver in water
Anodic oxidation	<ul style="list-style-type: none"> • Disinfection demonstrated 	<ul style="list-style-type: none"> • Pretreatment needed (depending on effect of pH and hardness) • Effect on <i>Legionella</i> in biofilms not known
UV (ultraviolet) disinfection	<ul style="list-style-type: none"> • Proven disinfection technique • Simple to use 	<ul style="list-style-type: none"> • Effective only at point of application; no control downstream (no residual) • Not suitable for turbid waters • No effect on biofilm formation
Ultrafiltration at point of entry to the building or system	<ul style="list-style-type: none"> • Physical disinfection barrier • Effective removal of biomass and particles 	<ul style="list-style-type: none"> • No inactivation of <i>Legionella</i> downstream of the filter within system • Effect on formation of biofilms and sediment not known
Point-of-use filters	<ul style="list-style-type: none"> • Physical barrier • Easy to install (may require some modification of the outlet) • Suitable for hot and cold-water systems • Good for use in systems exposing high-risk patients 	<ul style="list-style-type: none"> • Only suitable at point of use • Must be replaced regularly • Particulates in water may reduce flow and operational life • Expensive
Pasteurization heat with flushing	<ul style="list-style-type: none"> • Disinfection barrier • Useful as short-term remedial measure • Simple to apply in hot-water installation 	<ul style="list-style-type: none"> • Transient effect on <i>Legionella</i> • No limitation of biofilm formation • Scalding risk
Non-oxidizing biocides	<ul style="list-style-type: none"> • Proven technique for cooling systems 	<ul style="list-style-type: none"> • Not suitable for potable water systems • Most not applicable to spa pools • Resistant populations may develop • Need to alternate two different biocides • Often concentrations cannot be readily monitored • Difficult to neutralize for sampling purposes

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des méthodes alternatives de contrôles des *Legionella* dans les systèmes d'eau et dans les tours aéro-réfrigérantes (Bartram 2007).

- Recolonisation des réseaux

La détection de légionelles quelque temps après décontamination des réseaux d'eau chaude peut s'expliquer par le manque d'efficacité des traitements (difficulté de mise en application notamment), la présence de bras morts, la sélection de bactéries résistantes, mais suggère surtout que *Legionella* a développé des stratégies de survie face à ces traitements. Le principal facteur pouvant expliquer cette recolonisation est la présence de biofilm. Cette structure va jouer un rôle de barrière protectrice mais aussi être source de nutriments, permettant le développement de la bactérie (Murga et al. 2001). Le biofilm se définit comme une communauté plus ou moins complexe de microorganismes qui se fixent entre eux et à une surface. En général, les biofilms sont constitués de plusieurs espèces bactériennes, de protozoaires, d'algues voire de virus. De par leur constitution, les biofilms sont des matrices dynamiques en perpétuelle évolution. Ainsi le cycle de vie d'un biofilm a été décrit selon trois phases (Figure 4), (i) la fixation des bactéries sur un substrat, (ii) la maturation du biofilm et (iii) le détachement et la dispersion ultérieure dans l'environnement (Donlan 2002, Wolcott et al. 2013).



Figure 4 : Cycle de vie d'un biofilm d'après Alfred B. Cunningham, John E. Lennox, and Rockford J. Ross, Eds. 2001-2008 (Alfred B. Cunningham 2008)

Pecastaings et ses collaborateurs ont mis en place un modèle de microplaques permettant la croissance monospécifique de biofilms de *L. pneumophila in vitro* (Pecastaings et al. 2010). Les capacités de *L. pneumophila* à s'associer avec d'autres microorganismes (Watnick and Kolter 2000) ainsi que la présence de pili CAP de type IV (Competence and

adherence associated pili) (Stone and Kwaik 1999), lui permettent de coloniser un biofilm déjà formé en moins de deux heures (Declerck et al. 2007). L'intégration des légionelles au sein de ces milieux va être facilitée par la présence de différents facteurs (Figure 5) tels que la nature du matériau de la surface colonisée, la présence de composés chimiques (fer, calcium, magnésium, zinc...). La présence de nutriments et d'autres microorganismes, notamment les amibes, semble être les éléments clés pour favoriser leur croissance au sein de ces structures (Mampel et al. 2006). Toutefois des études ont montré, sur des biofilms initialement monospécifiques, que *P. aeruginosa* pouvait empêcher la colonisation de *L. pneumophila* mais que cette inhibition était atténuée en présence d'autres bactéries comme *Klebsiella pneumoniae* (Stewart et al. 2012).

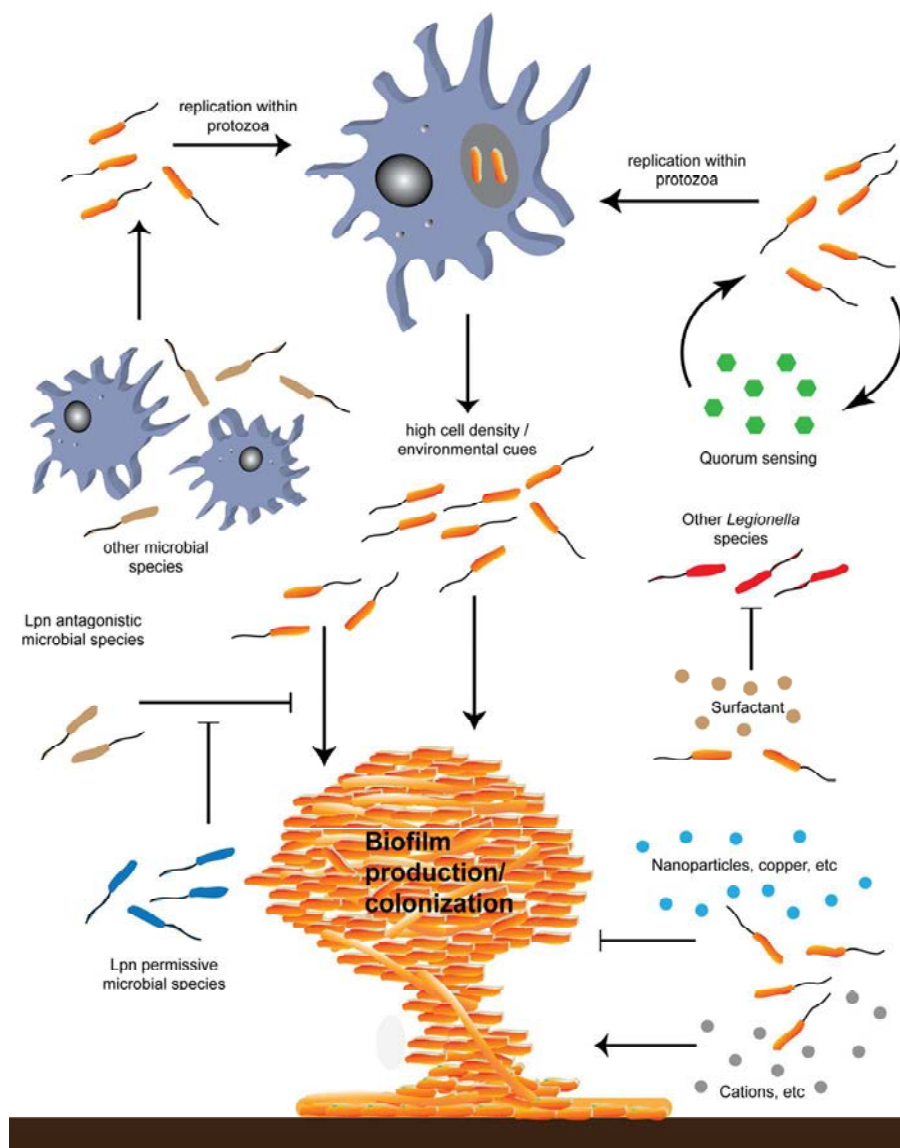


Figure 5 : Schéma des différents facteurs pouvant intervenir dans la colonisation d'un biofilm par *Legionella pneumophila* (Abdel-Nour et al. 2013). *L. pneumophila* est représentée en orange (Lpn), les protozoaires en bleu, *P. aeruginosa* en marron, signaux environnementaux tels que le quorum sensing, hexagones vert, espèces microbiennes permises en bleu, agent

tensio-actif, cercles bruns, autres espèces de *Legionella* en rouge, cations bivalents, cercles gris et les nanoparticules et cuivre, cercles bleus.

L. pneumophila peut se fixer à diverses surfaces dans l'environnement (Rogers et al. 1994, Squinazi 2006) mais la colonisation des biofilms est déterminée par un grand nombre de paramètres. Le schéma ci-dessus montre quelques facteurs impliqués dans la formation de biofilms à *L. pneumophila*. Les signaux environnementaux peuvent également influencer les changements dans le métabolisme cellulaire de *L. pneumophila* qui favorisent la production de biofilm et sa colonisation (quorum sensing) (Kimura et al. 2009, Spirig et al. 2008, Tiaden and Hilbi 2012), la présence d'autres espèces (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) et des paramètres physico-chimiques (cations, calcium, zinc, cuivre) (Geesey et al. 2000, Rogers et al. 1994) vont soit inhiber soit favoriser la colonisation et la production de biofilm.

De plus la présence de plusieurs microorganismes différents tels que les amibes va permettre aux légionelles d'échapper aux conditions défavorables de croissance telles que la dessiccation ou la désinfection. L'interaction avec *Acanthamoeba* va accroître la résistance de la légionelle notamment par la formation de kystes capables de survivre après des traitements thermiques (80°C pendant 10 min) et chloré (50 ou 100 mg/L) (Kilvington and Price 1990, Storey et al. 2004).

Une autre stratégie de survie mise en place face aux différents stress est le passage de l'état viable cultivable à l'état viable non cultivable. Cette forme particulière de survie suscite de nombreuses interrogations et la définition de l'état VBNC est encore très controversée.

3. ETAT VIABLE NON CULTIVABLE (VBNC)

3.1 Définition (s) de l'état VBNC

Afin de résister aux conditions défavorables de l'environnement, les bactéries sporulantes ont développé des structures de résistance (endospores), leur permettant de retourner vers un état végétatif lorsque les conditions redeviennent favorables. Jusqu'au début des années 80, aucune technique n'était connue pour détecter les bactéries vivantes non sporulantes, et c'est l'utilisation combinée des méthodes de microscopie à fluorescence et de

détection d'activité cellulaire qui a permis de démontrer la présence de bactéries vivantes sous forme végétative non cultivables mais métaboliquement actives.

En 1982, Xu et ses collaborateurs furent les premiers à décrire des bactéries possédant une activité métabolique mais incapables de croître sur milieu standard après un stress. Ce phénomène, identifié pour *E. coli* et *V. cholerae*, fut nommé comme étant un état viable non cultivable (Xu et al. 1982). Depuis, de nombreuses études ont démontré que la plupart des bactéries non sporulantes, seraient capables de survivre sous cet état pendant une exposition à un environnement défavorable (Byrd et al. 1991, Colwell 2000) tel que *Campylobacter jejuni* (Bovill and Mackey 1997), *Helicobacter pylori* (Adams et al. 2003), *L. pneumophila* (Steinert et al. 1997), *Listeria monocytogenes* (Besnard et al. 2002), *Pseudomonas* (Lowder et al. 2000), *Salmonella enterica* (Reissbrodt et al. 2002), *Shigella dysenteriae* (Rahman et al. 1996), *Vibrio vulnificus* (Whitesides and Oliver 1997) par exemple. De nos jours quelques 85 espèces de bactéries ont été identifiées comme pouvant exister à l'état VBNC. Cet état concerne aussi bien des espèces non pathogènes (18 espèces sur les 85 évoquées précédemment), que des espèces pathogènes (51 espèces pathogènes pour l'Homme et 16 pour d'autres organismes tels que les poissons, les invertébrés marins et les plantes) (Li et al. 2014).

Toutefois la définition de l'état viable non cultivable est controversée (Puspita et al. 2012). Pour certains, la forme VBNC n'existerait pas à l'état naturel, mais serait décrite ainsi car les conditions optimales de culture de ces organismes en laboratoire ne seraient pas connues (Joseph et al. 2003). Bien que les techniques moléculaires, telles que le séquençage métagénomique, permettent de caractériser certains facteurs de croissance nécessaires à la culture des bactéries non cultivables, ces données ne sont pas encore suffisantes pour permettre de déterminer avec certitude tous les paramètres essentiels à leur culture effective *in vitro* (donc l'amélioration des milieux de culture). La combinaison des études moléculaires et physiologiques semble donc nécessaire pour connaître et identifier les facteurs qui favorisent la croissance de ces bactéries initialement non cultivables. La principale difficulté étant de reproduire parfaitement les conditions environnementales qui varient constamment, même si de gros progrès ont été fait à ce jour grâce à la co-culture et la détection des microcolonies (Stewart 2012).

D'autres auteurs estiment que l'état viable non cultivable n'est qu'une étape vers la sénescence et un état de mort programmée (Aizenman et al. 1996, Thomas et al. 2002). La perte de cultivabilité serait donc un des premiers signes conduisant à la mort des bactéries. Des interactions protéines-protéines seraient à l'origine de ces signaux de mort cellulaire programmée. (Nystrom 2003).

Enfin, la définition qui semble fédérer le plus grand nombre d'auteurs établit l'état VBNC comme étant une stratégie de survie face à des conditions environnementales défavorables (modification de la température, du pH, de l'osmolarité, l'absence de certains nutriments, les stress chimiques, la présence ou non de lumière...). Cet état est réversible lorsque les conditions redeviennent favorables. Les bactéries seraient alors capables d'entrer dans un état leur permettant de survivre plusieurs mois voire plusieurs années. Les principales caractéristiques de cet état étant la perte de cultivabilité, la réduction du métabolisme, une modification de la morphologie cellulaire et de la composition membranaire (Fakruddin et al. 2013). L'analyse des profils protéiques d'*Enterococcus faecalis* par exemple tend à confirmer que l'état VBNC fait partie intégrante du cycle physiologique de ces bactéries et qu'il est susceptible d'être activé après différents stress (Heim et al. 2002). Cet état serait réversible et les bactéries retrouveraient leur potentiel à croître sur milieu de culture soit après un retour à des conditions favorables soit suite à l'interaction avec des cellules « hôtes ». De plus cet état VBNC serait une protection contre des agents mortels pour la bactérie. Ainsi *V. vulnificus* résisterait à des stress potentiellement mortels tel que l'exposition à la chaleur, les métaux lourds, des antibiotiques, à l'éthanol, à une variation de pH et à des stress oxydant. La bactérie pourrait ensuite être revivifiée (Nowakowska and Oliver 2013).

Dans l'environnement naturel, les conditions évoluent ce qui implique que les bactéries sont sans cesse exposées à des stress. Plusieurs études montrent qu'au sein des suspensions bactériennes utilisées *in vitro* se trouvent déjà différentes formes bactériennes (Ducret et al. 2014, Epalle et al. 2014), notamment les formes VBNC, ce qui laisse supposer que cet état ne serait pas un état transitoire mais une phase du cycle de vie des bactéries. Cependant la revivification de seulement 26 espèces a pour l'instant été démontrée (Li et al. 2014). De plus, Pinto et collaborateurs évoquent une « fenêtre de revivification » définie comme étant une période pendant laquelle les bactéries, sous la forme VBNC, peuvent être de nouveau cultivables. L'hypothèse serait que les formes VBNC d'une même espèce peuvent être revivifiables pendant une durée déterminée et qu'ensuite cette faculté de revivification serait perdue (Pinto et al. 2013). Des études précédentes montrent qu'il existe des variations entre les espèces puisque *Citrobacter freundii* a pu être de nouveau cultivé après 11 ans de famine (Dhiaf et al. 2008) alors d'autres bactéries ne sont plus capables de croître sur milieu de culture après seulement quelques jours (Roszak et al. 1984). *V. cholerae* (Senoh et al. 2010) a pu être revivifié par les cellules eucaryotes jusqu'à 91 jours après être entré dans un état VBNC même si une diminution du nombre de cellules revivifiées a été observée au cours du temps. Des résultats similaires ont été publiés pour *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus hirae* (Lleo et al. 2001).

La capacité à entrer dans l'état VBNC peut être un avantage pour la bactérie, mais représente un challenge en terme de détection de ces formes dans les écosystèmes ou les prélèvements cliniques. En effet, les méthodes de détections par culture vont alors sous-estimer le nombre de bactéries viables. Pour les espèces bactériennes causant des infections humaines, la sous-estimation ou la de non-détection de cellules viables peut poser de graves problèmes, d'autant plus si les formes VBNC gardent leur pouvoir infectieux, pour le contrôle de la qualité des réseaux. Depuis 30 ans, les recherches pour identifier et mieux comprendre cet état VBNC se sont multipliées et ont permis de mettre en évidence de nombreux stimuli induisant cette forme de survie.

3.2 Les facteurs d'inductions de l'état VBNC

Parmi les signaux provoquant l'état VBNC, les plus étudiés sont : la privation de nutriments, les modifications de température et de pH et la présence de chlore et ses dérivés. De nombreux autres facteurs semblent pouvoir induire l'état VBNC parmi lesquels la lumière, la teneur en sels (Gin and Goh 2013), la pasteurisation (Zhao et al. 2013), la concentration en cuivre (Grey and Steck 2001).

La privation de nutriments ainsi que les changements de température sont les causes directes du passage plus ou moins rapide à l'état VBNC de nombreuses bactéries, par exemple, *Campylobacter jejuni* entrent en état VBNC plus rapidement que *E. coli* qui survit mieux dans des conditions défavorables (Cook and Bolster 2007, Korhonen and Martikainen 1991).

Les basses températures vont induire l'état VBNC chez les bactéries telles que *Yersina pestis*, alors qu'une augmentation de la température est nécessaire pour générer les formes VBNC de *Enterobacter agglomerans* (Reissbrodt et al. 2002). *L. monocytogenes*, peuvent être induites à l'état VBNC par le manque d'humidité (Dreux et al. 2007) et *V. cholerae*, *E. coli*, *S. flexneri*, *S. enterica* par l'absence de nutriments (Senoh et al. 2012). Ainsi les études montrent que chaque espèce bactérienne développe sa propre adaptation face aux stress.

Legionella fait partie de ces bactéries capables de survivre sous cet état VBNC après différents stress tels que la privation en nutriments (Steinert et al. 1997), les traitements par chocs thermiques (Allegra et al. 2008, Epalle et al. 2014), les traitements par chocs chlorés (Alleron et al. 2008, Ducret et al. 2014, Garcia et al. 2007) ainsi que les ultrasons (Declerck et al. 2010).

3.3 Les facteurs de revivification

De nombreuses bactéries peuvent survivre à l'état VBNC, pour autant toutes n'ont pas pu être re-cultivées sur milieu de culture. Ceci semble indiquer que les conditions permettant leur revivification n'ont pas encore été déterminées. Par exemple, les formes VBNC de *L. monocytogenes*, induites par le manque d'humidité, n'ont pas pu être revivifiées malgré une exposition dans une atmosphère saturée en humidité (Dreux et al. 2007). A contrario, Senoh et son équipe ont montré que les formes VBNC de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *E. coli* (quelles que soient leur type : entérohémorragique, entérotoxigénique ou entérotoxigénique), *S. flexneri* et *S. enterica* ont été revivifiées par co-culture avec les cellules HT-29, Caco-2, T84, HeLa, Intestine 407 et les cellules CHO (Senoh et al. 2012). *Aeromonas hydrophila* a pu être revivifiée en utilisant un milieu liquide contenant de la catalase (Wai et al. 2000). Ces espèces semblent donc être pathogènes même lorsqu'elles se trouvent à l'état VBNC, alors que Cappelier et ses collaborateurs montrent que *L. monocytogenes* n'est plus virulente à l'état VBNC (test de pathogénicité en présence de cellules HT29 et inoculation à modèle de souris) (Cappelier et al. 2005). Mais cette équipe montre que les formes VBNC de *L. monocytogenes* ont pu être revivifiées après culture sur œuf embryonné de poulet et retrouvent leur pathogénicité sur les cellules HT-29 et le modèle de souris utilisé (Cappelier et al. 2007). Ce phénomène a aussi été observé avec la bactérie *Vibrio harveyi*. Les formes VBNC, n'exprimant plus le gène de l'hémolysine, et les formes VBNC revivifiées ont été inoculées au poisson zèbre. Les résultats montrent que seules les formes VBNC revivifiées sont létales (Sun et al. 2008). Ces bactéries ont donc besoin d'une étape préalable de revivification pour retrouver leur pouvoir infectieux. Ce mécanisme de revivification préalable semble être aussi nécessaire à *L. pneumophila* lorsqu'elle est induite par un choc thermique (Epalle et al. 2014).

Il semble donc que de nombreux paramètres influencent la revivification des formes VBNC, parmi lesquels les souches utilisées, les facteurs d'induction mais aussi l'âge des formes VBNC ainsi que les méthodes utilisées pour induire la revivification (Pinto et al. 2011).

Le tableau suivant, d'après Li et collaborateurs, liste de façon non exhaustive les facteurs d'induction et de revivification pour de nombreuses souches bactériennes (Li et al. 2014). Cet état de la littérature sur les formes VBNC montre ainsi que de nombreux paramètres différents peuvent induire et revivifier les bactéries.

Species	VBNC state inducing factor	Resuscitation condition	Resuscitation window	References
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Starvation			Lemke and Leff, 2006
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Starvation	Temperature upshift		Rahman et al., 2001 ; Maalej et al., 2004
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Starvation, chemicals (copper)			Byrd et al., 1991 ; Alexander et al., 1999
<i>Arcobacter butzleri</i>	Starvation	Rich medium, NOT temperature upshift	270 days	Fera et al., 2008
<i>Bacillus cereus</i>	Pulsed electric field			Rowan, 2004
<i>Burkholderia cepacia</i>	Starvation			Lemke and Leff, 2006
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Low pH, high temperature, osmotic pressure			Reviewed by Inglis and Sagripanti, 2006 2006
<i>Campylobacter coli</i>	Starvation, low pH, low temperature	Embryonated chicken eggs, NOT rich medium		Thomas et al., 2002 ; Chaveerach et al., 2003
<i>Campylobacter jejuni</i>	Starvation, low pH, low temperature	Rich medium, rich medium with gas mixture, mouse intestine, embryonated chicken eggs	15 days	Bovill and Mackey, 1997 ; Thomas et al., 2002 ; Chaveerach et al., 2003 ; Cools et al., 2003 ; Baffone et al., 2006 ; Cook and Bolster, 2007
<i>Campylobacter lari</i>	Starvation, low temperature			Thomas et al., 2002
<i>Citrobacter freundii</i>	Starvation, high temperature	Rich medium with/ without enterobacterial autoinducer	11 years	Reissbrodt et al., 2002 ; Dhiaf et al., 2008
<i>Cytophaga allerginae</i>	Aerosolization			Heidelberg et al., 1997
<i>Edwardsiella tarda</i>	Starvation, low temperature	Rich medium with temperature upshift, embryonated chicken eggs		Du et al., 2007
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Starvation			Byrd et al., 1991
<i>Enterobacter agglomerans</i>	High temperature	Rich medium with enterobacterial autoinducer		Reissbrodt et al., 2002
<i>Enterobacter cloacae</i>				Oliver, 2010
<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>Streptococcus faecalis</i>)	Starvation, low temperature	Rich medium with temperature upshift, embryonated chick eggs, NOT agar with sodium pyruvate/ beef liver catalase/ superoxide dismutase	60 days	Byrd et al., 1991 ; Lleò et al., 1998 , 2001
<i>Enterococcus faecium</i>	Starvation, low temperature	Rich medium, NOT agar with sodium pyruvate/beef liver catalase/ superoxide dismutase	7 days	Lleò et al., 2001
<i>Enterococcus hirae</i>	Starvation, low temperature	Rich medium, NOT agar with sodium pyruvate/ beef liver catalase/ superoxide dismutase	60 days	Lleò et al., 2001
<i>Escherichia coli</i>	Starvation, light, oxidative stress, high temperature, chemicals (chlorination)	Rich medium with enterobacterial autoinducer, minimal medium with amino acids, supernatant of active growing culture, temperature upshift		Gourmelon et al., 1994 ; Reissbrodt et al., 2002 ; Oliver et al., 2005 ; Cook and Bolster, 2007 ; Asakura et al., 2008
<i>Francisella tularensis</i>				Oliver, 2010
<i>Haemophilus influenzae</i>				Ehrlich et al., 2002
<i>Helicobacter pylori</i>	Starvation	NOT heat shock, NOT agar with catalase		Adams et al., 2003
<i>Klebsiella aerogenes</i>				Oliver, 2010
<i>Klebsiella planticola</i>	Aerosolization			Heidelberg et al., 1997
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Starvation			Byrd et al., 1991
<i>Legionella pneumophila</i>	Starvation, chemicals (disinfectants NaOCl and NH ₂ Cl), <i>Hartmannella vermiformis</i> supernatant	Amoebae		Steinert et al., 1997 ; García et al., 2007 ; Alleron et al., 2008 ; Buse et al., 2013
<i>Listeria monocytogenes</i>	Starvation, low pH, low temperature, low salinity, chemicals (food preservatives), light, pulsed electric field	NOT rich medium with/ without sodium pyruvate		Besnard et al., 2002 ; Rowan, 2004 ; Cunningham et al., 2009 ; Lindbäck et al., 2010
<i>Micrococcus luteus</i>	Starvation	Rich medium, supernatant of active growing culture	6 months	Mukamolova et al., 1998b

Species	VBNC state inducing factor	Resuscitation condition	Resuscitation window	References
<i>Micrococcus varians</i> (<i>Kocuria varians</i>)				Oliver, 2005
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Starvation, oxygen limitation, altered temperature	Rich medium, supernatant of active growing culture, Rpf		Kuznetsov et al., 2004 ; Shleevea et al., 2004
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Starvation, oxygen limitation	Rich medium with catalase	3.5 months	Downing et al., 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Starvation, low temperature, chemicals (copper)	Temperature upshift, rich medium with copper chelator		Leung et al., 1995 ; Dwidjosiswojo et al., 2011
<i>Pseudomonas putida</i>	Starvation			Lemke and Leff, 2006
<i>Salmonella enteritidis</i>	Starvation	Rich medium	<21 days	Roszak et al., 1984
<i>Salmonella oranienburg</i>	Starvation, salinity	Rich medium with Rpf, supernatant from active growing culture		Panutdaporn et al., 2006
<i>Salmonella typhi</i>	Starvation			Cho and Kim, 1999
<i>Salmonella typhimurium</i>	Starvation, low temperature, light, chemical (chlorination)	Rich medium with enterobacterial autoinducer, heat shock, NOT agar with catalase/ temperature upshift		Caro et al., 1999 ; Reissbrodt et al., 2002 ; Gupte et al., 2003 ; Oliver et al., 2005
<i>Serratia marcescens</i>	Aerosolization			Heidelberg et al., 1997
<i>Shigella dysenteriae</i>				Oliver, 1995
<i>Shigella flexneri</i>				Oliver, 1995
<i>Shigella sonnei</i>				Oliver, 1995
<i>Staphylococcus aureus</i>				Zandri et al., 2012
<i>Staphylococcus epidermidis</i>				Zandri et al., 2012
<i>Vibrio alginolyticus</i>				Du et al., 2007
<i>Vibrio cholera</i>	Starvation, low temperature	Human intestine, eukaryotic cell lines, rabbit intestine	110 days	Colwell et al., 1985 , 1996 ; Senoh et al., 2010
<i>Vibrio fluvialis</i>	Starvation	Rich medium	6 years	Amel et al., 2008
<i>Vibrio mimicus</i>				Oliver, 1995
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Starvation, low temperature, low salinity	Temperature upshift	2 weeks	Bates and Oliver, 2004 ; Wong and Wang, 2004 ; Wong et al., 2004
<i>Vibrio vulnificus</i> (type 1 & 2)	Starvation, low temperature	Rich medium, temperature upshift, mice, clams	3 days	Nilsson et al., 1991 ; Oliver and Bockian, 1995 ; Oliver et al., 1995 ; Biosca et al., 1996 ; Wong and Liu, 2008
<i>Yersinia pestis</i>	Starvation, low temperature	Rich medium		Pawlowski et al., 2011

Tableau 2 : Agents pathogènes pour l'Homme capables d'entrer dans un état VBNC (Li et al. 2014).

Les différentes études sur *L. pneumophila* ont permis de mettre en évidence plusieurs facteurs de revivification, dont le premier fut l'utilisation d'œuf embryonné de poulet (Hussong 1987), mais aussi les co-cultures avec les amibes (Allegra et al. 2008, Alleron et al. 2008, Dusserre et al. 2008, Steinert et al. 1997) ou l'enrichissement du milieu de culture en pyruvate et glutamate (Ducret et al. 2014). Comme pour les autres bactéries pouvant survivre sous la forme VBNC, le retour à la croissance sur milieu de culture de *L. pneumophila* VBNC semble dépendre de nombreux paramètres qui ne sont pas encore tous connus à ce jour. Le tableau 3 montre quelques exemples d'induction de l'état VBNC et des conditions de revivification chez *L. pneumophila*.

Souche de <i>L. pneumophila</i>	Facteurs d'inductions de l'état VBNC	Méthodes de détection des formes VBNC	Références
Philadelphia (séro groupe 1)	Famine	Œuf embryonné de poulet	(Hussong 1987)
Bloomington (séro groupe 3)	Traitement chloré	Activité respiratoire	(Bej et al. 1991)
Différentes souches environnementale clinique mutant non virulent	Eau Ultra pure	Activité estérase Protozoaire cilié (<i>Tetrahymena pyriformis</i>)	(Yamamoto et al. 1996)
Philadelphia (séro groupe 1)	Famine	Acridine Orange Amibes (<i>Acanthamoeba castellanii</i>)	(Steinert et al. 1997)
Suzuki (séro groupe 1)	Traitement thermique, pH	Activité métabolique Amibes (<i>Acanthamoeba castellanii</i>)	(Ohno et al. 2003)
Différents sérogroupes	Traitement NaOCl	Amibes (<i>Acanthamoeba polyphaga</i>)	(Garcia et al. 2007)
Différents sérogroupes	Traitement thermique	Amibes (<i>Acanthamoeba polyphaga</i>) Production d'ATP	(Allegra et al. 2008)
Paris (séro groupe 1)	Traitement monochloramine	Intégrité membraniare Activité estérase Amibe (<i>Acanthamoeba castellanii</i>)	(Alleron et al. 2008)
Philadelphia (séro groupe 1)	Traitement Ultrasons	Amibe (<i>Acanthamoeba castellanii</i>)	(Declerck et al. 2010)
Philadelphia (séro groupe 1)	Traitement HOCl	Activité esterase Amibes (<i>Acanthamoeba castellanii</i>)	(Ducret et al. 2014)

Tableau 3 : Etat récapitulatif de différentes conditions induisant l'état VBNC chez *L. pneumophila*

3.4 Méthodes de détection des formes VBNC

La découverte des formes VBNC des bactéries engendre le besoin de mettre au point des techniques de détection permettant leur mise en évidence (d'autant plus lorsque les formes VBNC sont pathogènes).

Ces techniques de détection se basent sur différents critères que sont l'intégrité membranaire, l'absorption d'acides aminés marqués, l'activité métabolique, respiratoire ou l'expression globale des gènes (Ramamurthy et al. 2014).

Les techniques de PCR quantitative et de PCR couplée à une électrophorèse à gradient dénaturant (DGGE) permettent de dénombrer une population bactérienne (Eiler and Bertilsson 2006). Malheureusement ces techniques présentent deux inconvénients:

- leur incapacité à identifier spécifiquement et avec certitude les formes viables (cultivables ou non).

- leur incapacité à différencier l'ADN libre d'un échantillon de l'ADN associé intracellulaire (l'ADN de cellules mortes).

Afin d'améliorer la détection des bactéries vivantes, la technique de v-PCR a été développée grâce à l'utilisation de l'EMA (Ethidium MonoAzide) ou de la PMA (Propidium MonoAzide) (Chen and Chang 2010). Il semblerait ainsi qu'il soit désormais possible de détecter l'ADN spécifiquement associé aux formes vivantes de bactéries (Delgado-Viscogliosi et al. 2009). L'inconvénient majeur de la technique de v-PCR est son principe de fonctionnement, basée sur l'intégrité membranaire comme critère de viabilité. En effet plusieurs publications suggèrent que le traitement des échantillons par l'EMA ou par le PMA est susceptible de prévenir l'amplification d'ADN correspondant aux formes viables (selon la dose d'inhibiteur employée) (Cawthorn and Witthuhn 2008). L'EMA est ainsi susceptible de pénétrer dans certaines bactéries vivantes et dans celles qui présentent des dommages réversibles de leur membrane/paroi. L'EMA comme le PMA peut aussi induire une certaine cytotoxicité et introduire la présence de faux négatifs (Fittipaldi et al. 2012, Yanez et al. 2011)

Les méthodes de détection basées sur les propriétés membranaires des bactéries utilisent notamment l'acridine orange ou le LIVE/DEAD BacLight bacteria viability kit (Giao et al. 2009). L'acridine orange émet une fluorescence verte lorsqu'il est fixé à l'ADN double brin et rouge lorsqu'il est sur l'ADN simple brin. Le LIVE/DEAD kit repose sur l'association de deux marqueurs fluorescents que sont le SYTO9 et l'iodure de propidium (IP). Ces deux molécules se fixent à l'ADN mais diffèrent par leur mode d'entrée dans la cellule. Le SYTO9 pénètre même si la membrane est intacte alors que l'IP n'entre que lorsque les membranes sont poreuses. Les cellules « viables » émettent alors une fluorescence verte sous une longueur d'onde d'excitation à 488 nm alors que les cellules mortes apparaissent en rouge sous une longueur d'onde d'excitation à 370 nm.

D'autres approches peuvent être utilisées pour caractériser les cellules viables. Dans la technique DVC (direct viable count), l'acide nalidixique bloque l'invagination des enveloppes bactériennes empêchant toute séparation des cellules issues de la division cellulaire. Les

formes viables vont alors s'allonger alors que les formes mortes restent inchangées (Kogure et al. 1979). L'utilisation de DNase I va aussi permettre la différenciation entre les cellules viables et mortes. Seules les cellules possédant une membrane intacte vont pouvoir empêcher la digestion de leur ADN par la nucléase exogène (Pawlowski et al. 2011).

Les formes VBNC se caractérisent aussi par le maintien de leur métabolisme, ainsi des méthodes de détection basées sur la mesure de l'activité estérase (kit Chemchrome V6, Chemunex) ou de la mesure de l'activité respiratoire (Lindback et al. 2010) ont été développées.

Ces techniques permettent la différenciation des bactéries viables et mortes. Cependant afin de mieux caractériser les formes VBNC, et plus particulièrement chez *L. pneumophila*, l'association de plusieurs techniques est souvent préférable. Ainsi les techniques de mesure de l'activité estérase, de la production d'ATP, de cytométrie en flux ou de revivification après co-culture sur amibes sont souvent couplées (Allegra et al. 2008, Alleron et al. 2008, Giao et al. 2009).

3.5 Marqueurs protéiques de l'état VBNC chez *L. pneumophila*

Plusieurs études ont été menées afin de mieux caractériser les différentes protéines de virulence chez *L. pneumophila* comme par exemple les mécanismes d'entrée dans les cellules de la bactérie (Fuche et al. 2014) et la formation de LCV (Bruckert and Abu Kwaik 2014). Mais, à ce jour, il existe peu d'études basées sur l'analyse du protéome de *L. pneumophila* à l'état VBNC. Cependant Alleron et ses collaborateurs décrivent 9 protéines qui sont surexprimées à l'état VBNC, dont 4 (la sous-unité protéolytique ClpP ATP dépendante, la protéine de membrane externe DSBA2, la protéine Mip et la protéine lpl2247) ont été identifiées comme étant impliquées dans les mécanismes de virulence, les autres étant impliquées dans le métabolisme énergétique. Ces données confirment que ces cellules - encore métaboliquement actives - expriment certains facteurs de virulence. Néanmoins la présence de ces facteurs de virulence ne semble pas suffire pour conserver leur propriété invasive puisque les légionelles n'ont pas pu être revivifiées après culture sur amibe (Alleron et al. 2013). De plus ces études sont rendues difficiles par le plus faible taux d'expression des protéines lorsque la bactérie est dans l'état VBNC.

D'autres techniques que l'électrophorèse bidimensionnelle telle que le RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et le ribotyping, par exemple, ont également montré leur intérêt dans l'identification des espèces de *Legionella*, en permettant l'obtention de profils

spécifiques d'espèces (Salloum et al. 2002). Plus récemment, la méthode de SBT (Sequence-Based Typing) s'est révélée efficace pour le typage des différents isolats de *L. pneumophila* (Ratzow et al. 2007).

Par ailleurs, une seule protéine a été identifiée comme étant requise pour la sortie de l'état VBNC : la protéine Rpf (resuscitation-promoting factor) chez *Micrococcus luteus* (Mukamolova et al. 1998). Des protéines homologues ont été retrouvées chez de nombreuses bactéries (Kana and Mizrahi 2010) dont *L. pneumophila*. A ce jour, aucune étude portant sur cette protéine ou son homologue chez *Legionella* n'a été publiée.

4. PLAN DES EXPERIENCES

Les contrôles systématiques des réseaux d'eau chaude sanitaire confirment la présence récurrente de *Legionella pneumophila*. Dès lors, comme nous l'avons décrit précédemment, les mesures de désinfection sont mises en place. Les techniques de décontamination les plus couramment utilisées sont les chocs thermiques et les chocs chlorés. Mais la persistance de cas nosocomiaux (réseaux hospitaliers) en l'absence de mise en évidence de formes cultivables dans les échantillons investigués tend à indiquer que les légionelles s'y maintiennent sous leur formes VBNC (Allegra et al. 2011a).

Nous avons donc choisi d'étudier par cytométrie en flux dans un premier temps le comportement de 3 souches de *L. pneumophila* suite à des traitements thermiques. Cette technique étant un outil efficace pour la détection de formes VBNC comme les précédentes études menées au laboratoire l'ont démontré (Allegra et al. 2008). Nous avons donc réalisé une étude sur l'état physiologique de *L. pneumophila* pour des températures allant de 50 à 70°C et pour des temps d'exposition jusqu'à 60 minutes.

Puis, dans un second temps, nous avons évalué le pouvoir infectieux de ces souches vis-à-vis des amibes (*A. polyphaga*) et des cellules types macrophage-like ou cellules épithéliales alvéolaires après un traitement thermique de 30 min à 70°C de façon à nous rapprocher le plus possible de la réglementation en vigueur en la matière (DGS 2002).

Enfin nous avons étudié l'effet d'un traitement au dioxyde de chlore sur ces 3 souches. Nous avons d'abord analysé par cytométrie en flux et par culture sur milieu BCYE, la présence des formes VBNC après différents traitements allant de 0 à 7 mg/L pendant 60 min. Puis nous avons évalué le pouvoir infectieux des formes VBNC présentes après le

traitement chloré vis-à-vis des amibes (*A. polyphaga*) et des cellules type macrophage-like et cellules épithéliales alvéolaires.

III. MATERIELS ET METHODES

1. LES CELLULES ET LEURS CONDITIONS DE CULTURE

1.1 *Legionella pneumophila* sg 1

Trois souches de *L. pneumophila* sg 1 d'origine différente ont été utilisées afin de comparer leur comportement face au stress induit par traitement thermique et chimique : Lp1-008 référence Philadelphia, Lp1-044 clinique et Lp1-RNN environnementale.

Lp1-008 Philadelphia est issue de la souche de référence, elle possède en plus un plasmide contenant le gène permettant l'expression de la Green Fluorescent Protein (GFP) ainsi qu'une résistance au chloramphénicol. Elle nous a été fournie par le Centre de référence des Légionelles (CNRL) de Lyon.

Lp1-044 clinique a été isolée à partir d'un lavage broncho-alvéolaire d'un cas clinique survenu à l'Hôpital nord de Saint Etienne.

La troisième souche utilisée, Lp1-RNN environnementale, a été isolée du réseau d'eau chaude sanitaire du centre de réanimation néonatale de l'Hôpital Nord de Saint Etienne en 2000. Elle n'a pas provoqué de cas clinique.

Les cultures ont été isolées puis entretenues par repiquages tous les 3 à 4 jours, sur géloses et incubées à 37°C. Le milieu BCYE a été utilisé pour les souches Lp1-044 clinique et Lp1-RNN environnementale et le milieu BCYE contenant 8 µg/L de chloramphénicol pour la souche Lp1-008 référence. L'historique de repiquage de chaque souche a été conservé.

Les souches ont été conservées à -80°C au moyen des tubes Cryobank (Mast diagnostic, Amiens, France).

1.2 *Acanthamoeba polyphaga*

Le modèle choisi, *Acanthamoeba polyphaga*, a été cultivé en monocouche à 30°C dans des flasques de 25 cm² contenant 10 mL de bouillon peptone-yeast-glucose (PYG). Après cinq jours de culture, les amibes confluentes ont été placées pendant 15 min sur de la glace, puis centrifugées et remises en suspension dans le même milieu. Les numérations cellulaires ont été effectuées avec une cellule de comptage sous microscope inversé et la suspension a été ajustée de manière à obtenir 5.10⁵ *A. polyphaga* par puits pour les essais de co-culture avec les légionelles.

1.3 Les lignées cellulaires

- Les macrophages-like, U937 et HL60

Les deux lignées utilisées lors de l'étude sont des cellules monocytaires d'origine humaine, non adhérentes et non différenciées (lignée pro-monocytes néoplasiques U937 et lignée des promyéloblastes HL-60). Elles ont été cultivées en suspension, à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ respectivement dans du milieu RPMI-1640 contenant de la L-Glutamine et 10% de sérum de veau fœtal (SVF) ou du milieu IMDM avec 20% de SVF, dans des flasques de 75 cm². Les cellules ont été repiquées tous les 3 jours.

Avant leur utilisation elles ont été différenciées en cellules ressemblant à des macrophages à l'aide de PMA. Cette molécule stimule de façon spécifique l'activité de la protéine kinase C qui joue un rôle important dans la prolifération et la différenciation des monocytes. Pour cela 10⁶ cellules ont été incubées pendant 48 h avec 100 nM de PMA dans du milieu de culture dans des plaques 24 puits à 37°C sous une atmosphère de 5% en CO₂. La différenciation des cellules, qui deviennent adhérentes, a été confirmée par la détection de marqueurs spécifiques CD11b, CD11c et CD68 en utilisant un cytomètre de flux BD FACSCalibur (Seitz et al. 1998).

-Les cellules épithéliales A549

Les cellules épithéliales alvéolaires adhérentes A549 ont été cultivées 24h à 37°C sous atmosphère contenant 5 % de CO₂ dans du milieu DMEM Nutriment Mixture F12 HAM contenant 10 % de SVF dans des flasques de 175 cm². Ces cellules étaient repiquées tous les 3 jours de la façon suivante : incubation de 10 min dans une solution de trypsine-EDTA, puis centrifugation des cellules pendant 5 min à 1200 rpm et le culot était mis en suspension dans 10 mL de milieu de culture. Après dénombrement à l'aide d'une cellule de comptage, une flasque de 175 cm² était de nouveauensemencée. Pour les tests de co-culture avec les légionelles, une croissance de ces cellules a été obtenue dans les mêmes conditions en plaque 24 puits et vérifiées par microscopie (forme et bonne viabilité des cellules)

Toutes ces lignées cellulaires ont été stockées dans l'azote liquide, en cryotubes dans le milieu de culture contenant 50% SVF et 10% DMSO. La décongélation était réalisée le plus rapidement possible afin de minimiser le stress des cellules.

2. TRAITEMENT DES SOUCHES DE LEGIONELLES

2.1 Choc thermique

Une suspension calibrée par mesure de densité optique (D.O de 0,2 à 600 nm correspondant à une concentration finale de 10^8 CFU/mL) de *L. pneumophila* a été préparée à partir de bactéries en phase stationnaire de croissance (4 jours de culture sur BCYE). Le traitement thermique a été réalisé dans un bain marie à différentes températures (50, 56, 60, 65 et 70°C) et pendant 5, 10, 30, et 60 min dans des tubes de cytométrie contenant 2 mL de suspension bactérienne. Après le choc thermique, 100 µL de suspension ont été étalés sur milieu BCYE, incubés pendant 10 jours à 37°C, afin de vérifier la cultivabilité des bactéries et 10 µL de suspension ont été analysés par cytométrie en flux afin de déterminer les proportions de légionelles viables cultivables, VBNC et mortes (Allegra et al. 2008).

2.2 Dioxyde de chlore

Les expériences de stress au dioxyde de chlore ont été réalisées dans des tubes en verre préalablement saturés par une solution de 100 mg/L de chlore pendant une heure puis rincés abondamment à l'eau distillée (Dupuy et al. 2011). La solution de dioxyde de chlore a été préparée à l'aide du kit Xziox (Ximax, France) dans de l'eau ultra pure. La concentration de la solution fraîchement préparée à 3500 mg/L, (donnée fabricant), a été vérifiée par colorimétrie avec le kit Chlore CHEMets kit, après dilutions successives.

Une suspension calibrée à 10^8 UFC/mL de chaque souche a été préparée et 2 mL de suspension ont été incubés à des concentrations de 0 à 10 mg/L pendant 1h à l'obscurité et à température ambiante. La réaction a été stoppée par l'ajout de thiosulfate de sodium à 0,1M final. Les suspensions ont été analysées par cytométrie en flux et 100 µL de suspension ont été étalés sur boîtes BCYE et incubés 10 jours à 37°C.

3. ETUDE DE VIABILITE DES LEGIONELLES

3.1 Détermination de la cultivabilité des légionelles par dénombrement sur milieu de culture BCYE

Immédiatement après le stress, 100 µL de chaque suspension bactérienne ont été étalés sur boîte BCYE. Les contrôles positifs ont été réalisés à partir de suspensions de *Legionella* non traitées à 10^8 UFC/mL diluées en série dans de l'eau physiologique (NaCl à 0,9%) à 10^3 cellules/mL puis 100 µL de suspension ont été étalés sur BCYE.

Toutes les boîtes ont ensuite été incubées à 37 ° C pendant 10 jours.

3.2 Etude de l'état physiologique des légionelles par cytométrie en flux

Afin de réaliser l'analyse par cytométrie en flux, chaque souche a été utilisée à une concentration de 10^6 UFC/mL. Pour Lp1-044 clinique et Lp1-RNN environnementale, les profils ont été obtenus en utilisant une combinaison de deux fluorochromes colorant les acides nucléiques, le Syto9, marqueur de viabilité, capable de s'intercaler dans l'ADN de cellules dont les membranes sont intactes et l'iodure de propidium (IP), marqueur de cellules lésées car ne pouvant pénétrer que les cellules avec des membranes endommagées. Pour Lp1-008 référence exprimant déjà un marqueur vert (GFP), seul l'iodure de propidium a été utilisé. L'émission fluorescente verte GFP ou de Syto9 a été recueillie dans le canal de fluorescence (FL1) (500 à 560 nm), et la fluorescence rouge de l'IP a été recueillie dans le canal FL3 (670 nm). Les mesures de cytométrie en flux ont été effectuées en utilisant un BD FACSCalibur et les résultats ont été analysés grâce au logiciel Cell Quest Software Pro (Becton Dickinson Biosciences) sous forme de cytogrammes. Ces cytogrammes ont permis la détermination de différentes populations nommées « régions », établie sur le principe décrit lors des études précédentes (Allegra et al. 2008).

4. EXPERIENCES DE CO-CULTURE DE LEGIONELLES SUR TAPIS CELLULAIRE

4.1 Co-culture *Legionella-Acantamoeba polyphaga*

La suspension d'amibes ajustée à 5.10^5 *A. polyphaga* par puits après 5 jours de culture, a été cultivée dans 2 mL de milieu PYG dans des plaques à 6 puits. Après 24h d'incubation à 30°C, le milieu nutritif a été remplacé par une solution saline - Pages' amoebal saline (PAS) - et incubé avec les souches de *L. pneumophila* sous différentes conditions.

Après les traitements thermiques, les légionelles ont été incubées avec les amibes dans des proportions de 10 légionelles pour 1 amibe (MOI 10) ou de 100 légionelles pour 1 amibe (MOI 100). Les températures de contact étaient de 30°C ou 37°C pendant 4 jours.

Après traitement au dioxyde de chlore, une MOI de 10 a été utilisée pour une température de contact de 30°C pendant 4 jours.

4.2 Co-culture *Legionella*-Macrophage-like ou cellules épithéliales

Les souches de *Legionella*, ayant subi différents traitements (thermique ou chloré), ont été mises en contact avec les macrophages ou les cellules épithéliales dans du milieu HBSS (Hank's Balance Salt Solution) et cultivées pendant 4 ou 6 jours à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% CO₂ à une MOI de 1 (Figure 6).

4.3 Analyse des légionelles après co-culture *Acantamoeba polyphaga*

Une action mécanique d'aspiration-refoulement à l'aide d'une pipette a été appliquée aux co-cultures (amibes + *Legionella* ou lignées cellulaires + *Legionella*). Cette étape entraînant une lyse totale des amibes ou lignées cellulaires a été vérifiée sous microscopie. Une première centrifugation à faible vitesse (900 rpm, 5 min) a été réalisée afin d'éliminer les plus gros débris. Puis le surnageant a été centrifugé à 7500 rpm pendant 8 min et le culot a été remis en suspension dans 110 µL d'eau physiologique. 100 µL ont été déposés sur milieu BCYE et incubés pendant 10 jours à 37°C. Les 10 µL restant ont été utilisés pour l'analyse en cytométrie en flux (cf paragraphe II 3.2)

4.4 Expériences de co culture de légionelles passées sur amibes –macrophages ou amibes-cellules épithéliales alvéolaires

Les cellules issues de la co-culture des légionelles traitées ou non avec *A. polyphaga* (MOI =10) pendant 4 jours à 30°C, ont été lysées et le surnageant a été centrifugé une première fois à 900 rpm pendant 5 min puis une seconde fois à 7500 rpm pendant 8 min.

Le culot a été remis en suspension dans 210 µL d'eau physiologique et la seconde co-culture, sur tapis de cellules macrophages-like ou cellules épithéliales préparée comme décrit dans le paragraphe II 1.3, a été réalisée en déposant 100 µL de cette suspension. Le reste a permis d'étaler 100 µL sur milieu BCYE incubés 10 jours à 37°C et 10 µL ont été analysés par cytométrie en flux.

Après 4 jours de culture les cellules ont été lysées et le surnageant prélevé a permis la culture sur BCYE et l'analyse par cytométrie en flux (Figure 6).

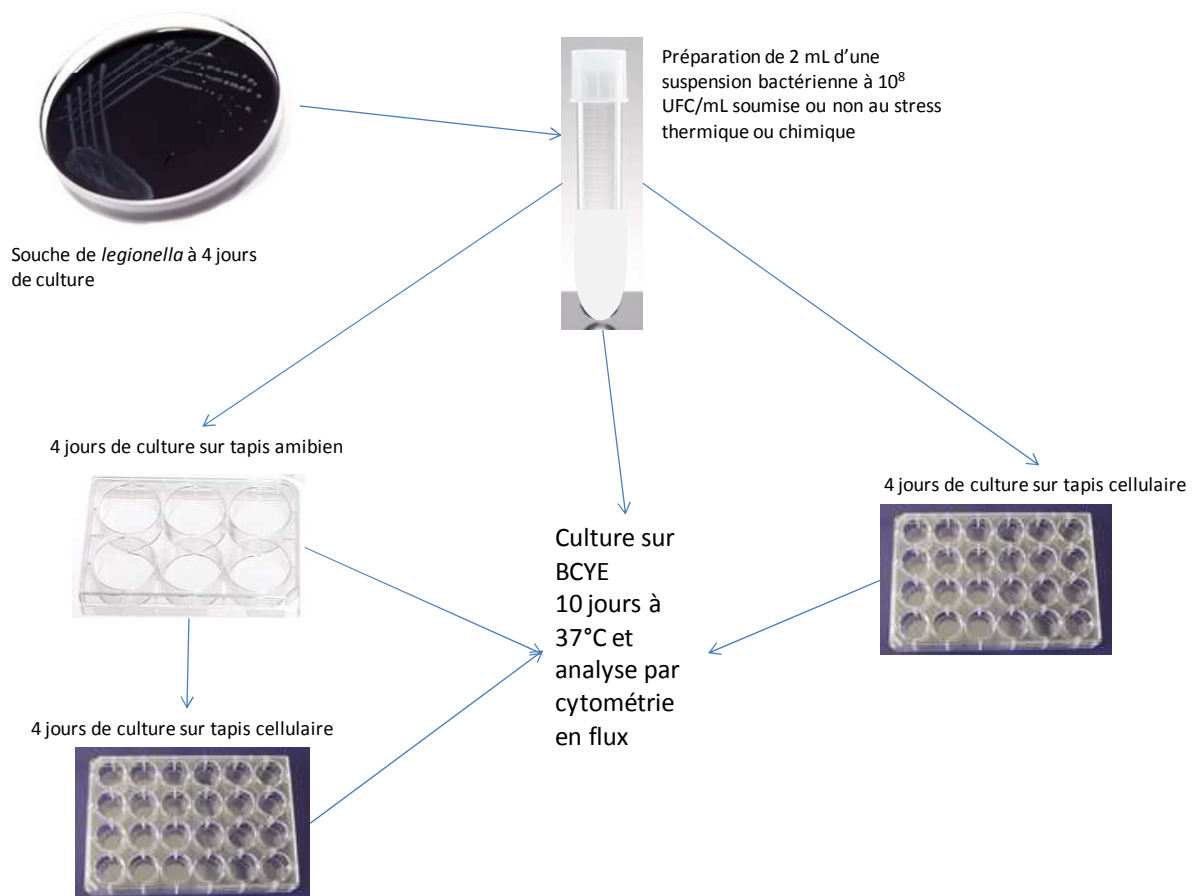


Figure 6 : Schéma récapitulatif des expériences de cultures sur cellules avec les souches de *L.pneumophila* soumise ou non à différents stress

4.5 Suivi des cultures par microscopie et vidéomicroscopie à fluorescence

Les cultures réalisées sur tapis amibien ou sur tapis cellulaire ont été suivies par microscopie à fluorescence à l'aide du microscope NIKON Eclipse Ti, après marquage au Syto9 pour les souches Lp1-044 clinique et Lp1-RNN environnementale ou directement pour la souche Lp1-008 référence, contenant le plasmide exprimant la protéine GFP. De plus la souche Lp1-008 référence a été suivie pendant 72h par vidéo-microscopie grâce à une plateforme motorisée placée dans une enceinte à 30°C reliée à un microscope à fluorescence. Cet équipement nous a permis de faire un suivi en temps réel de la co-culture des amibes avec la souche de référence Lp1-008 pendant plusieurs jours.

IV. RESULTATS

1. TRAITEMENT THERMIQUE

1.1 Culture sur BCYE et états physiologiques des bactéries

Dans cette étude nous avons soumis trois souches de *L. pneumophila* à différents traitements thermiques, la souche Lp1-044 clinique, la souche Lp1-RNN environnementale et la souche Lp1-008 référence Philadelphia. Les résultats ont été analysés par cytométrie en flux et par culture sur milieu BCYE. L'analyse par cytométrie en flux a été réalisée sur la base des travaux publiés précédemment par l'équipe (Allegra et al. 2008).

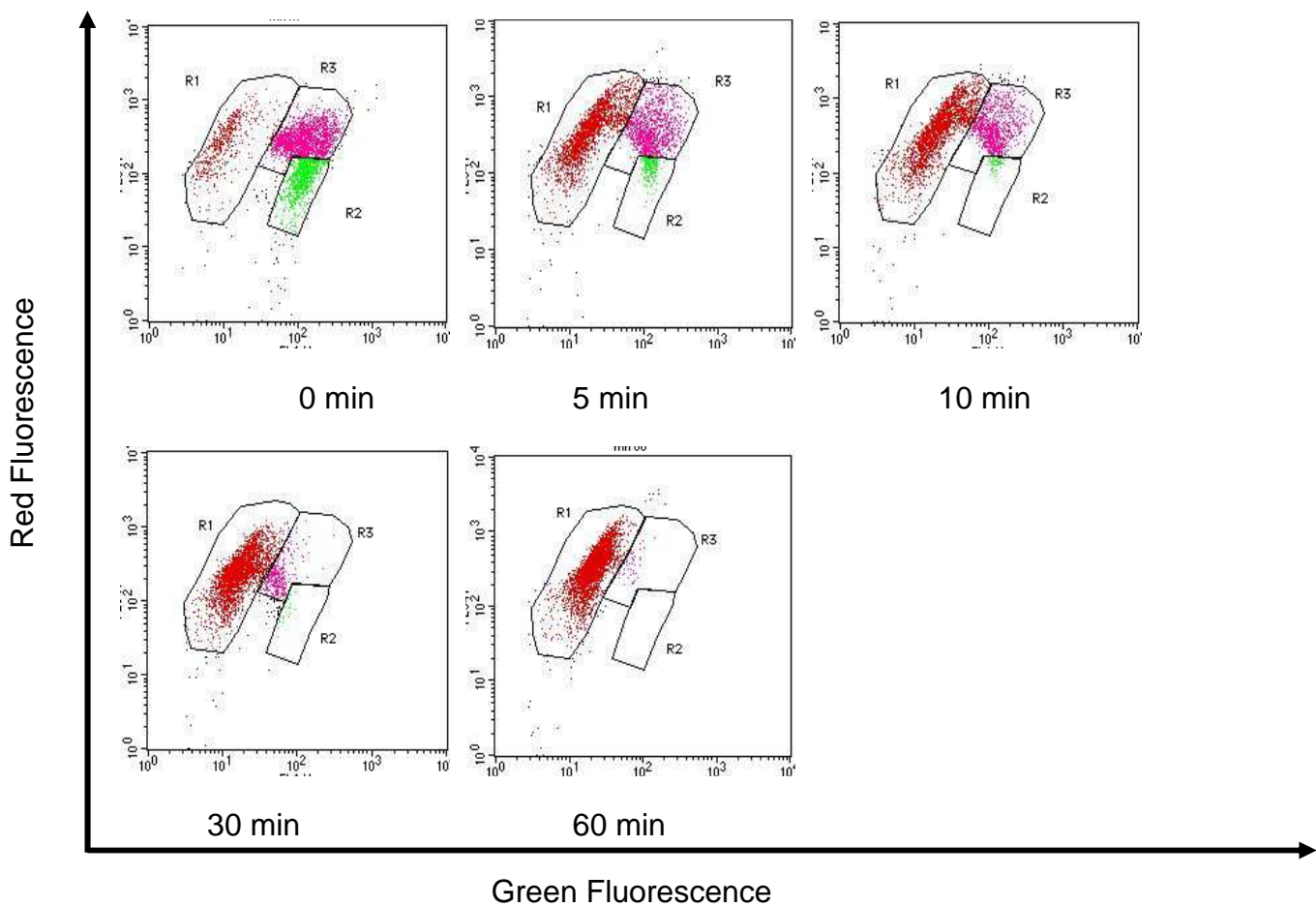


Figure 7 : Analyse cinétique par cytométrie en flux des formes physiologiques de Lp1-RNN environnementale après des traitements de choc thermique à 70°C de 0 à 60 min. Les bactéries ont été visualisées sur un tracé de points de fluorescence rouge PI (FL3) par rapport à la fluorescence verte SYTO 9 (FL1). La région R1 correspond à des cellules mortes. Les résultats de culture sur BCYE couplés aux résultats de fluorescence en Syto 9 ont été utilisés pour délimiter la région R2 (cellules viables et cultivables avec des membranes intactes). La région R3 (cellules VBNC) correspond à des bactéries dans un état intermédiaire avec des membranes compromises.

La figure 7 représente un exemple de caractérisation des différentes populations présentes après un traitement de 5, 10, 30 et 60 min à 70°C sur la souche Lp1-RNN environnementale. Les légionelles apparaissent sous 3 formes au sein d'une même souche, les formes viables cultivable (VC), région R2, les formes Viables non cultivables (VBNC), région R3, et les mortes (DC), région R1. Les cytogrammes nous permettent ainsi de déterminer le pourcentage de populations présentes pour différents stress. Dans ce cas présent, dès 5 min de traitement à 70°C la perte de culture visible en cytométrie en flux est confirmée sur milieu BCYE. Les formes VBNC semblent quant à elles rester dans les mêmes proportions (de l'ordre de 20%) jusqu'à 30 min de traitement alors que les formes DC augmentent rapidement après 5 minutes de traitement.

Les expériences réalisées sur les trois souches sont très reproductibles ce qui nous a permis d'établir un profil physiologique des souches en fonction des traitements thermiques imposés.

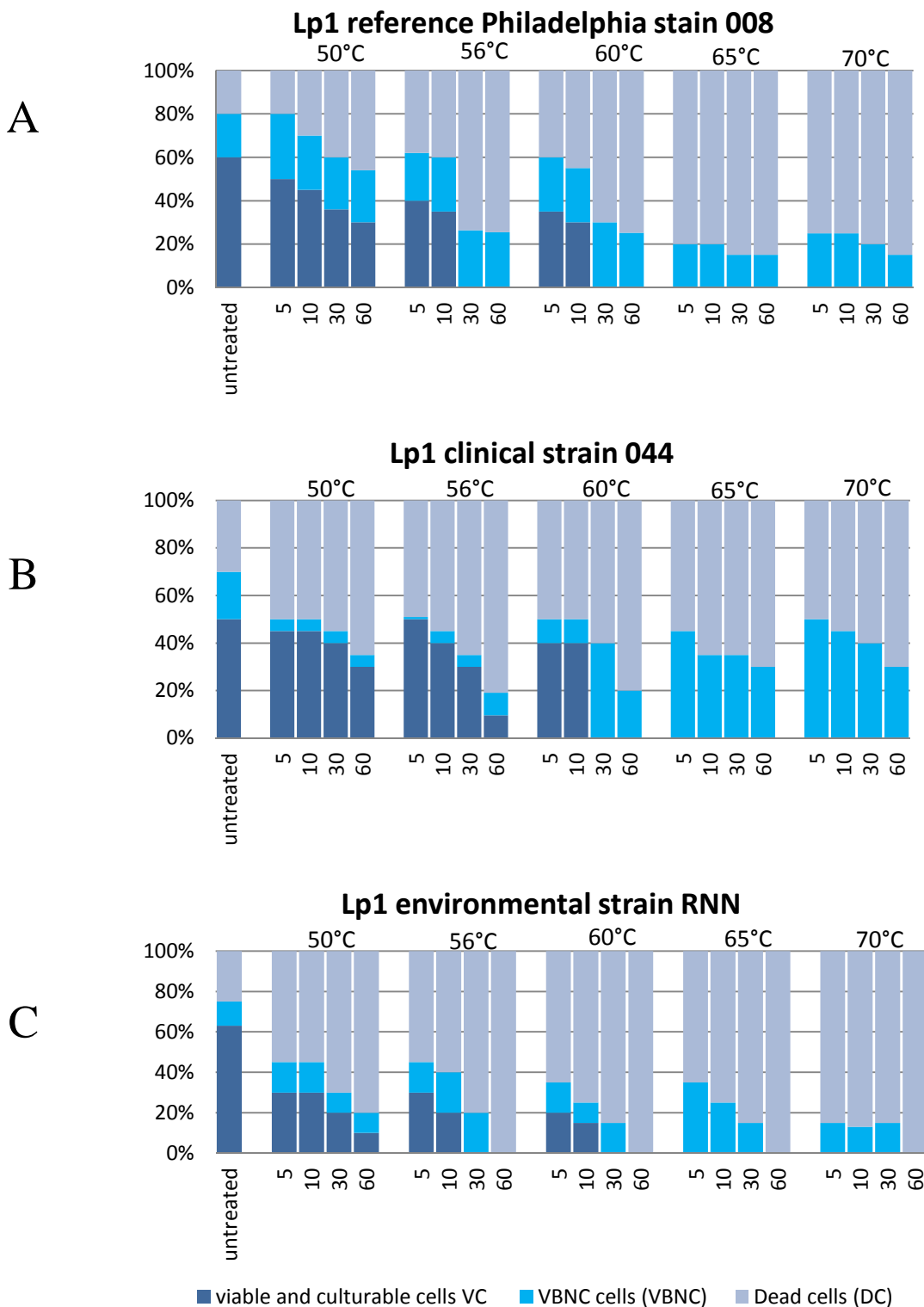


Figure 8 : Répartition des cellules viables cultivables (VC), cellules viables non cultivables (VBNC) et les cellules mortes (DC) observées après des traitements de choc thermique à 50, 56, 60, 65 et 70°C pendant 5, 10, 30 et 60 min. Les pourcentages des différentes formes ont été déterminés à l'aide de la cytométrie en flux comme décrit précédemment (Allegra et al. 2008). Les profils représentés sont la moyenne de 4 expériences séparées. A: souche de référence de *L. pneumophila* 008 référence; B : souche clinique 044 et C : souche environnementale RNN.

Chaque souche montre une répartition différente et ce même avant qu'elles ne subissent un stress thermique. En bref, les populations non traitées de la souche de référence ont été réparties comme suit: 60% des formes VC (écart-type ± 7), $20 \pm 6\%$ de formes VBNC et $20 \pm 3\%$ de formes DC. La distribution de la souche clinique non traitée a été comme suit: $50 \pm 6\%$ de formes VC, $25 \pm 3\%$ de formes VBNC et $25 \pm 4\%$ des formules DC alors que, pour la souche de l'environnement non traitée, les populations varient de $55 \pm 11\%$ pour les formes VC, $15 \pm 6\%$ pour les formes VBNC et $30 \pm 5\%$ pour les formes DC. Le pourcentage de DC dans les suspensions non traitées de la souche de l'environnement (Lp1-RNN) était toujours supérieur à celui des autres souches.

Dans un premier temps nous avons pu constater que les trois formes de légionelles étaient présentes dans les échantillons à l'état natif (sans traitement) avec une proportion de l'ordre de 50 à 65% de VC, 15 à 25% VBNC et 20 à 25% de DC en fonction des souches. Nous avons donc suivi l'évolution de ces populations après différents traitements thermiques. Quelle que soit la souche, une température de 50°C n'est pas suffisante pour stopper la cultivabilité des légionelles. Pour des températures supérieures, chaque souche va avoir un comportement différent en fonction du stress imposé. En effet, pour la souche Lp1-RNN environnementale une exposition de 60 min à des températures de 56°C et plus suffit à tuer toutes les cellules, or pour les 2 autres souches les formes VBNC persistent quelle que soit la température ou le temps d'exposition. Un traitement de 30 min à 56°C ou plus est nécessaire pour éliminer les bactéries cultivables de la souche Lp1-008 référence alors que la perte de cultivabilité de la souche Lp1-044 clinique n'est réalisée qu'après un traitement à 60°C pendant 30 min. Ce ne sont pas les seules différences notables entre ses 2 souches de légionelles, la population de formes VBNC de la Lp1-008 référence Philadelphia semble être constante (environ 20%) alors que pour la souche Lp1-044 clinique les formes VBNC semblent augmenter en fonction du traitement appliqué. La souche Lp1-RNN environnementale semble suivre le même profil que la souche Lp1-008 référence avec une proportion de l'ordre de 20% de formes VBNC pour des temps d'incubation inférieurs à 60 min.

Nous avons donc voulu étudier le comportement de ces formes VBNC « persistantes » (Lp1-RNN environnementale et Lp1-008 référence) ou nouvellement produites (Lp1-044 clinique) vis-à-vis des amibes et des cellules de l'immunité après un choc thermique de 30 min à 70°C (recommandations AFNOR).

1.2 Co-culture *Legionella*-Macrophage-like ou cellules épithéliales

Les 3 souches de légionelles ont été traitées 30 min à 70°C puis mises en culture avec les macrophages issus de la différenciation des lignées U937 ou HL60 ou les cellules épithéliales A549. Les cultures des bactéries avec les cellules ont été suivies par microscopie à fluorescence pendant 4 à 6 jours. Les images (Figure 9) représentent la culture des cellules U937 différenciées en macrophages avec les légionelles Lp1-008 référence non traitées (A et B) et traitées par choc thermique de 30 min à 70°C (C et D) après 24 h (A et C) et 96 h (B et D) d'incubation à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. La fluorescence est détectée sur les 4 clichés à l'intérieur des cellules ce qui semble indiquer la présence de légionelles viables. Les images A et B montrent clairement la présence de légionelles à l'intérieur des macrophages et qui semblent se multiplier au cours du temps. Au contraire les légionelles soumises au traitement thermique ne semblent pas se développer au sein des cellules. Ces résultats ont été confirmés par culture sur milieux BCYE. Un tapis bactérien de légionelles s'est développé à partir du surnageant de culture non traitées alors qu'aucune colonie n'a été décelée à partir de la culture avec les légionelles traitées thermiquement.

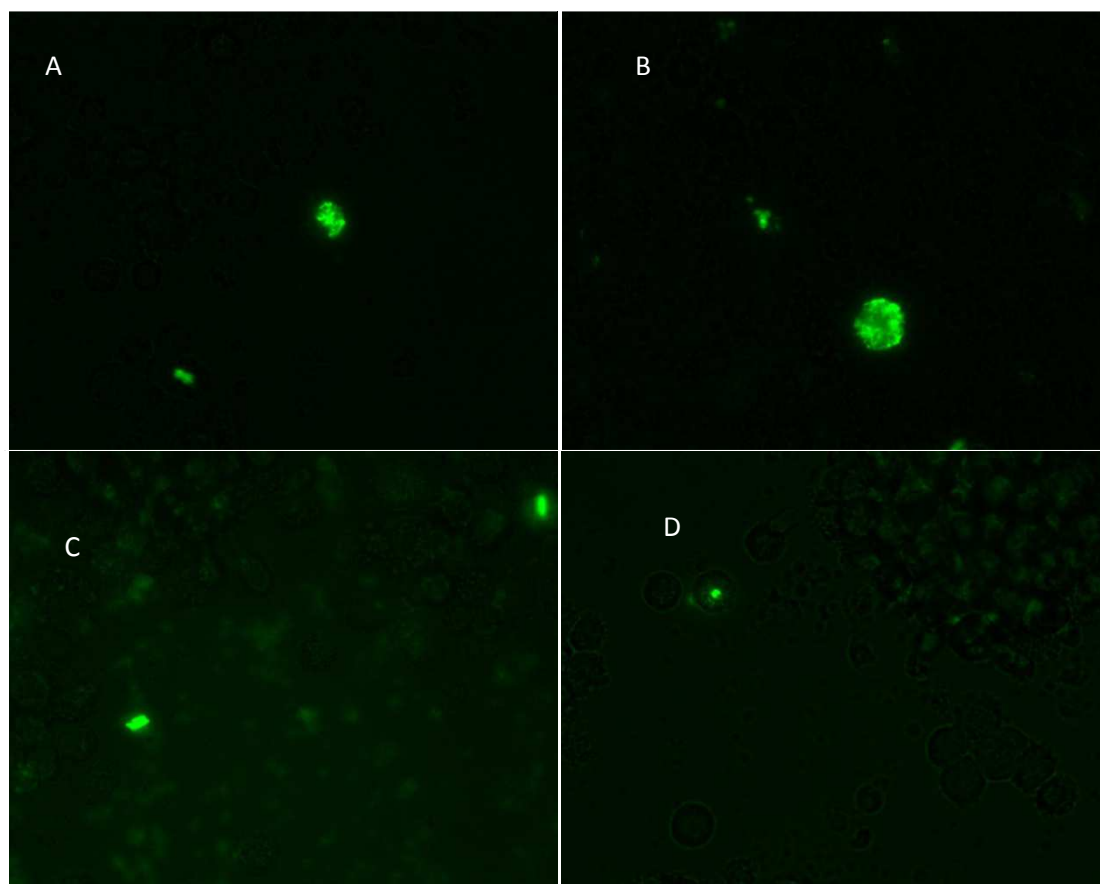


Figure 9 : Co-culture des macrophages-like (cellules U937 différenciées) avec la souche Lp1-008 référence, contenant le plasmide GFP (MOI 1). Non traitée, témoin (Photos A et B) ou traitées pendant 30 min à 70°C (photos C et D). Les photos A et C ont été prises après 24h de

contact et les photos B et D après 96h de contact à l'objectif x400. Malgré la présence de quelques formes VBNC à l'intérieur des cellules, aucune colonie n'a été détectée sur BCYE (pas de revivification).

Des résultats similaires ont été observés après culture sur cellules HL-60 différenciées et sur des cellules épithéliales alvéolaires.

De plus les souches Lp1-044 clinique et Lp1-RNN environnementale se comportent de façon identique et aucune colonie n'a été détectée après le stress de 30 min à 70°C quel que soit le type cellulaire utilisé.

Puisque d'après les précédents résultats, les seules formes bactériennes présentes après le choc thermique de 30 min à 70°C sont les VBNC et les DC, ces résultats laissent penser que les formes VBNC ne sont pas revivifiables après culture sur tapis cellulaire.

1.3 Co-culture *Legionella-Acanthamoeba polyphaga*

De nombreuses études ont démontré la capacité de certaines souches bactériennes à être revivifiables après culture avec des amibes (Allegra et al. 2008, Garcia et al. 2007, Steinert et al. 1997). Nous avons donc mis en culture les formes VBNC présentes après un choc thermique de 30 min à 70°C pour ces trois souches avec *A. polyphaga* à différentes MOI et différentes températures d'incubations. La souche Lp1-008 référence exprimant la GFP a permis de suivre l'évolution des cultures sous vidéomicroscopie (MOI 10 incubation 30°C). Les légionelles non traitées sont visibles à l'intérieur de l'amibe après 30 heures d'incubation (figure 10 A) alors que 10 heures de plus sont nécessaires pour observer de la fluorescence avec des bactéries VBNC (figure 10 B). Puis la multiplication des légionelles et la lyse des amibes ont pu être observées.

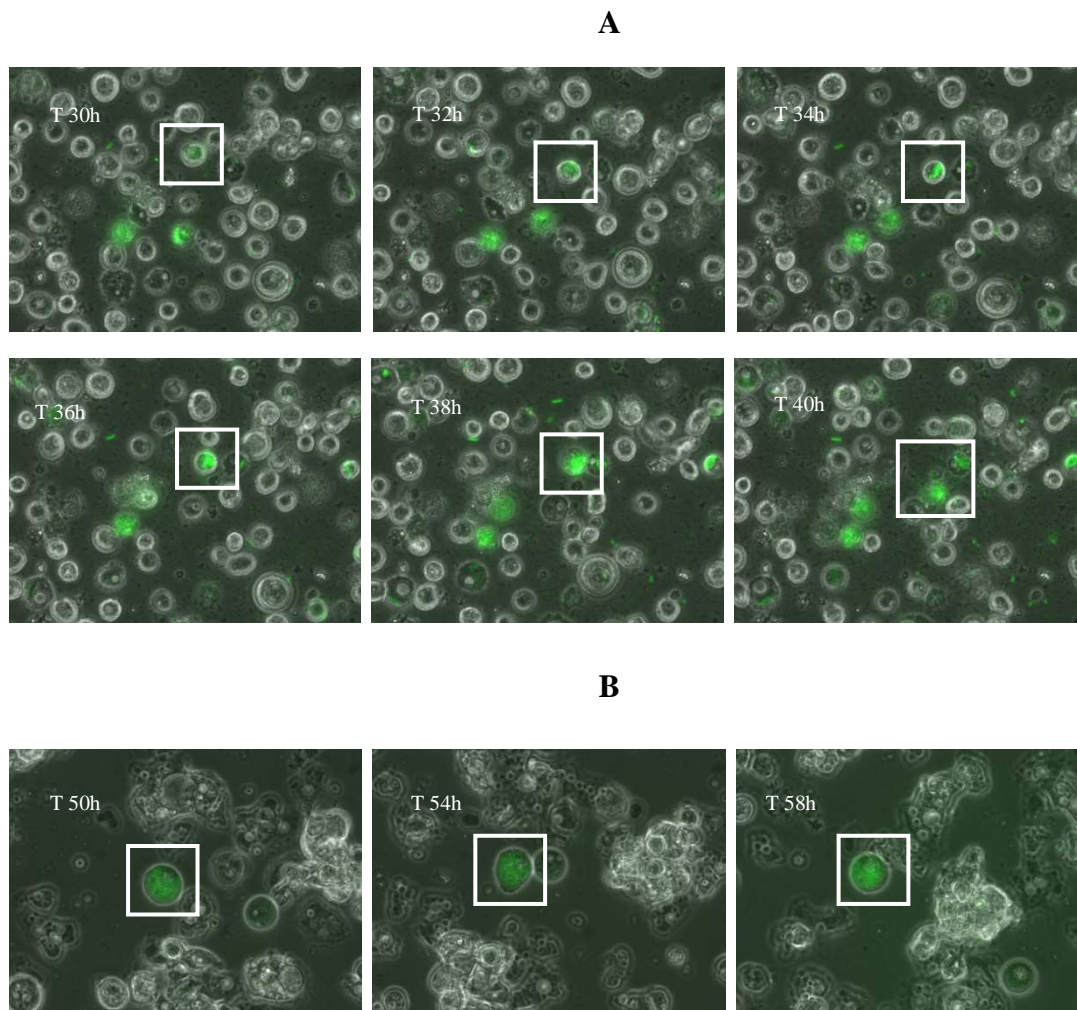


Figure 10 : Suivi par vidéo microscopie de l'infection de *A. polyphaga* par la souche Lp1-008 référence contenant le plasmide GFP. (A) Lp1-008 référence non traitée, témoin positif, (B) formes VBNC présentes après un traitement de 30 min à 70°C. Les photos ont été prises pendant 12 h, toutes les 2 h (A) ou 4 h (B), à compter de 30 h (A) ou 50 h (B) après l'infection.

Les résultats de culture sur tapis amibien des formes VBNC montrent des résultats divers (Figure 11). En effet, quelles que soient les conditions d'incubation et de MOI, les formes VBNC de Lp1-008 référence ont pu être à nouveau cultivées sur milieu BCYE. A l'opposé, la souche Lp1-044 clinique n'a jamais pu être revivifiée après coculture avec les amibes. Quant à la souche Lp1-RNN environnementale, une seule condition (incubation à 37°C MOI 100) n'a jamais permis d'observer de culture sur milieu solide.

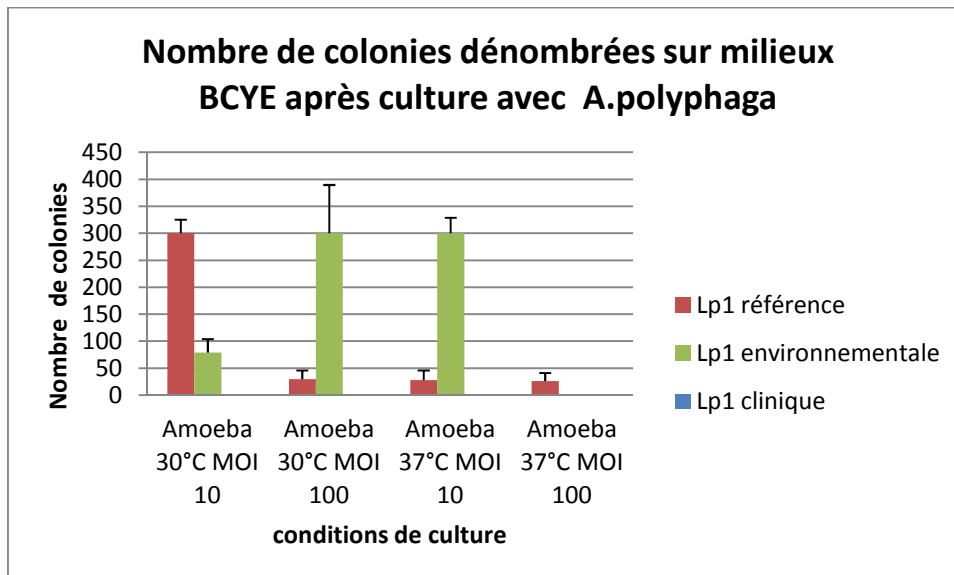
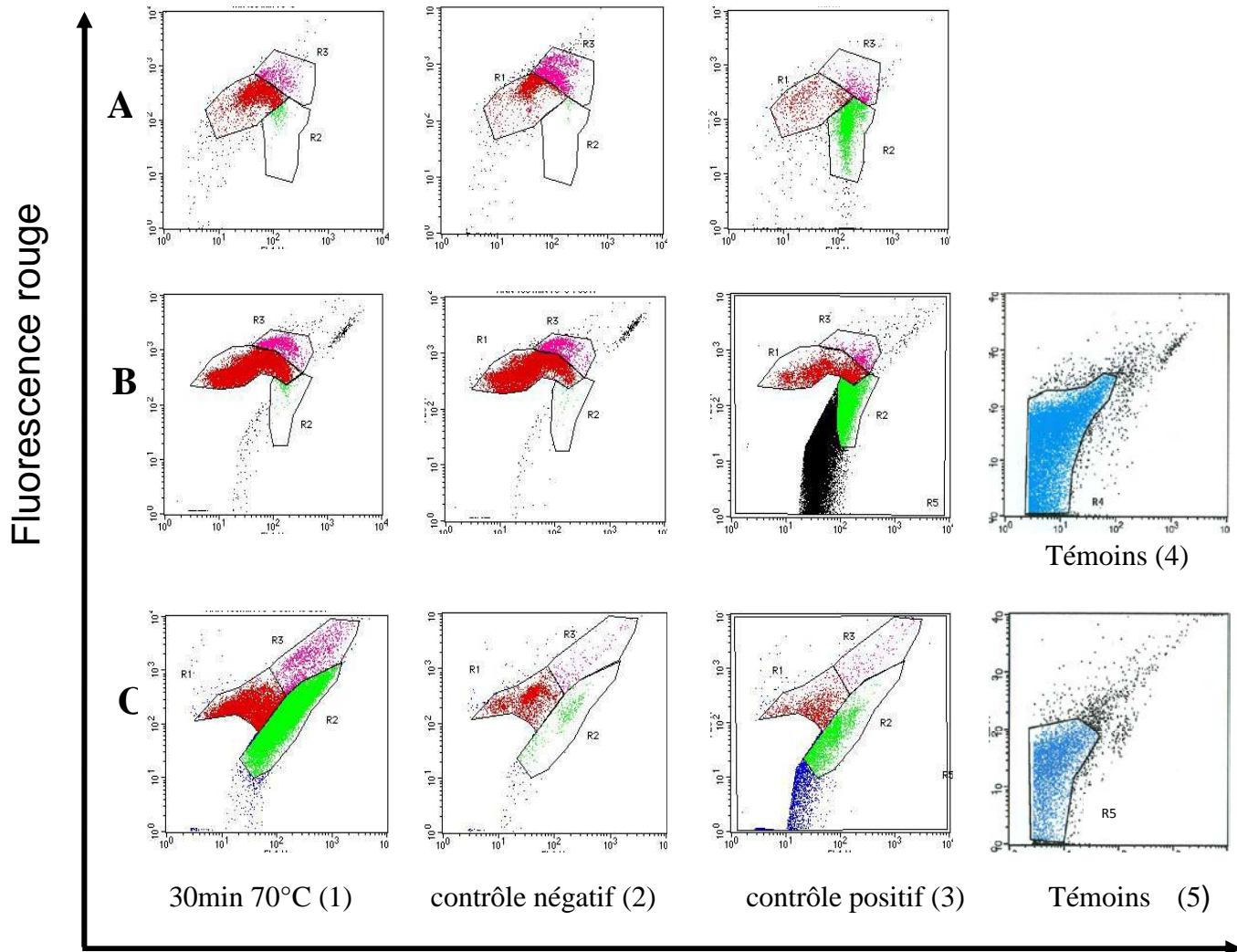


Figure 11 : Colonies dénombrées sur milieu BCYE après co-culture de *L. pneumophila* VBNC (traitement de 30 min à 70°C) et *A. polyphaga*. Quatre conditions expérimentales ont été testées (MOI de 10 et 100 et températures d'incubation de 30°C et 37°C).

1.4 Co-culture de légionelles passées sur amibes –macrophages et amibes-cellules épithéliales

Nous avons donc démontré que les formes VBNC de ces trois souches étaient incapables de cultiver à nouveau après culture sur cellules de types macrophages ou épithéliales. Par ailleurs certaines souches (Lp1-008 référence et Lp1-RNN environnementale), sous certaines conditions peuvent être revivifiées après culture avec *A. polyphaga*. Nous avons donc voulu savoir si ces formes VBNC présentes après un choc de 30 min à 70°C et revivifiées après co-culture sur amibes étaient capables d'infecter les cellules de l'immunité. L'étude a donc consisté à appliquer un traitement thermique aux souches Lp1-008 référence et Lp1-RNN, de réaliser une culture sur amibe à une MOI de 10 à 30°C pendant 4 jours puis de mettre en culture les surnageants bactériens avec des macrophages ou des cellules épithéliales. A chaque étape des tests en cytométrie en flux et des cultures sur milieu BCYE ont été réalisés.



Fluorescence verte

Figure 12 : Evaluation de l'état viable cultivable d'une suspension de Lp1-RNN environnementale par cytométrie en flux suite à un choc thermique (A), suite à un choc thermique et après 4 jours de culture sur tapis d'amibes (B), suite à un choc thermique, 4 jours de culture sur tapis d'amibes puis co-culture avec des cellules U937 différenciées en macrophages (C). Suspensions traitées par choc thermique à 70°C de 30 min (1) et 60 min (2), (3) suspensions non choquée, (4) témoins amibes sans bactéries (5) témoins cellules U937 différenciées incubées avec le lysat de *A. polyphaga* en l'absence de bactéries. Sur les cytogrammes, R1 représente les formes DC, R3 les formes VBNC, R2 les formes VC, R4 est la population d'amibes et R5 montre la population des cellules U937 et du lysat d'amibe. Pour une meilleure visualisation des bactéries, les populations R4 et R5 ont été soustraites des cytogrammes sur les figures B et C respectivement.

Les résultats sont présentés pour la souche Lp1-RNN environnementale. La figure 12 A confirme la perte de culture après un traitement de 30 ou 60 min à 70°C. Contrairement aux bactéries ayant subi un traitement de 30 min seulement, les légionelles soumises à la chaleur pendant 60 min ont été incapables de croître sur milieu BCYE après culture sur amibes

(Figure 12 B). Les légionelles, traitées ou non, ont été récupérées après la lyse des amibes pour être cultivées en présence de macrophages-like (HL-60 ou U937). Les résultats de culture et de cytométrie montrent que les légionelles qui ont été soumises à un stress de 30 min à 70°C ont été revivifiées après passage sur amibes et ont été capables d'infecter les cellules. Les légionelles non traitées ont infecté indifféremment les amibes et les cellules. Les légionelles ayant subi un traitement de 60 min à 70°C n'ont pas été revivifiées après culture sur amibes et par conséquent n'ont pu redevenir cultivables après culture sur cellules. D'autres procédés existent et le plus courant est la désinfection par des substances chimiques et notamment le chlore. Nous nous sommes donc intéressés pour la suite de cette étude aux effets que pourraient avoir le dioxyde de chlore sur ces trois souches bactériennes.

2. TRAITEMENT AU DIOXYDE DE CHLORE

Plusieurs études ont démontré l'efficacité de la désinfection des réseaux par le dioxyde de chlore (Zhang et al. 2007). Nous avons donc essayé de comprendre comment les légionelles pouvaient réagir suite à un choc au dioxyde de chlore. Pour cela nous avons voulu déterminer quelles concentrations en dioxyde de chlore étaient susceptibles de générer des formes VBNC. Nous avons soumis les souches à des chocs allant de 0 à 10 mg/L de ClO_2 pendant une heure à température ambiante à l'obscurité. Les échantillons ont ensuite été analysés par cytométrie en flux et par culture sur milieu BCYE.

2.1 Culture et état physiologique

Les premiers résultats ont montré que des concentrations inférieures à 4 mg/L ne permettaient pas de stopper la croissance des souches sur milieu de culture BCYE. Pour les concentrations comprises entre 4 et 5 mg/L les résultats sont très fluctuants et ne permettent pas de déterminer avec certitude la concentration idéale qui entraîne la perte de cultivabilité sur BCYE avec les méthodes de dosages utilisées. Pour des concentrations supérieures à 8 mg/L, les bactéries ont été lysées car rien n'est détectable en cytométrie en flux. Dès lors nous avons focalisé nos recherches sur des concentrations susceptibles de former des légionelles VBNC (6 et 7 mg/L de ClO_2).

De précédentes études ont montré la pertinence de l'utilisation de la cytométrie en flux pour l'analyse de l'effet du dioxyde de chlore sur des microorganismes mais jamais sur *Legionella* (Mogoa et al. 2011, Zhou et al. 2014). La figure 10 représente les différentes

populations obtenues après des traitements à des concentrations de 0, 4, 6 et 7 mg/L de dioxyde de chlore. Nous avons pu identifier les mêmes populations que lors d'un traitement thermique (VC, VBNC, DC) et il semble que les différentes souches se comportent de manière différente.

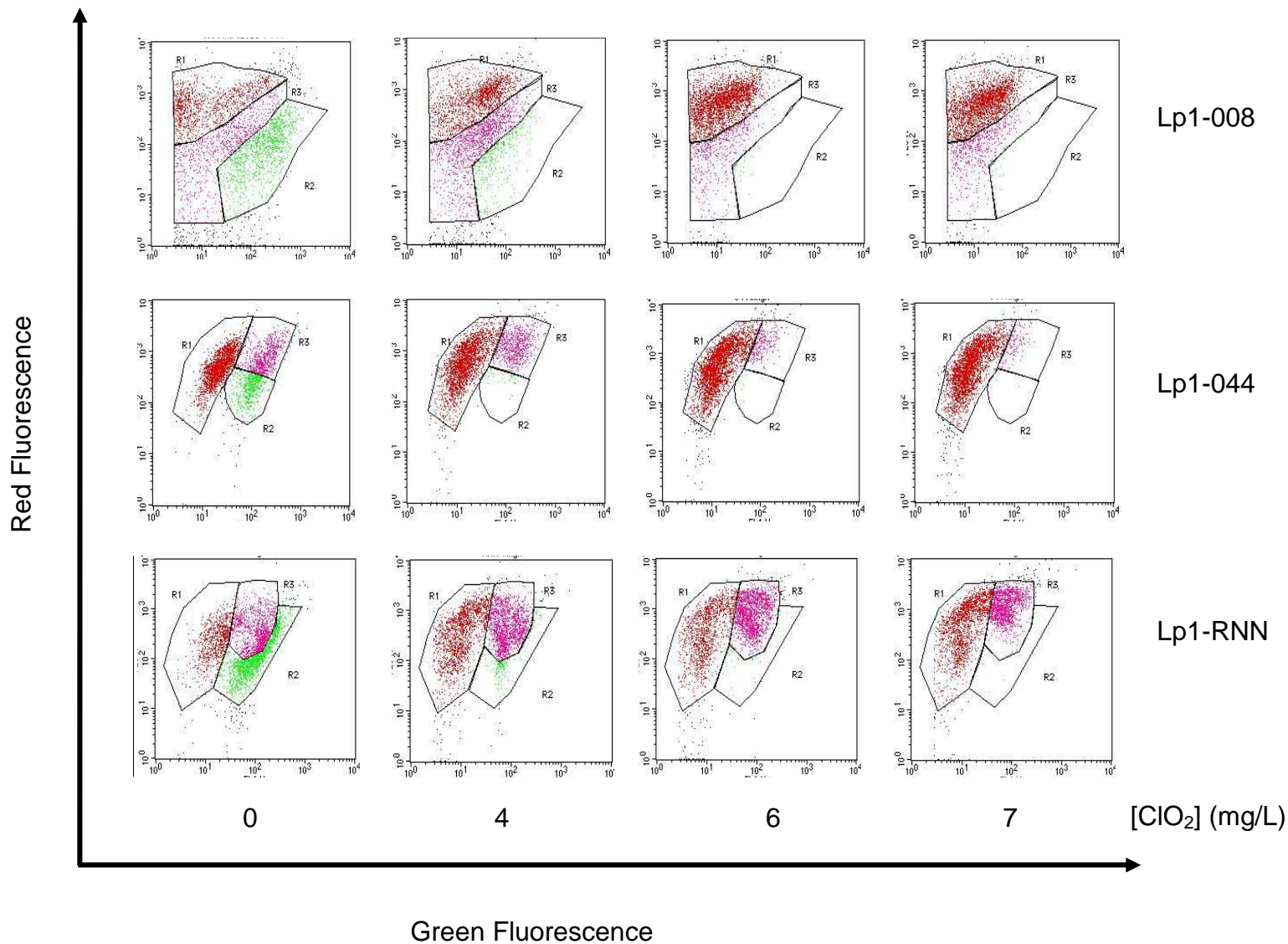
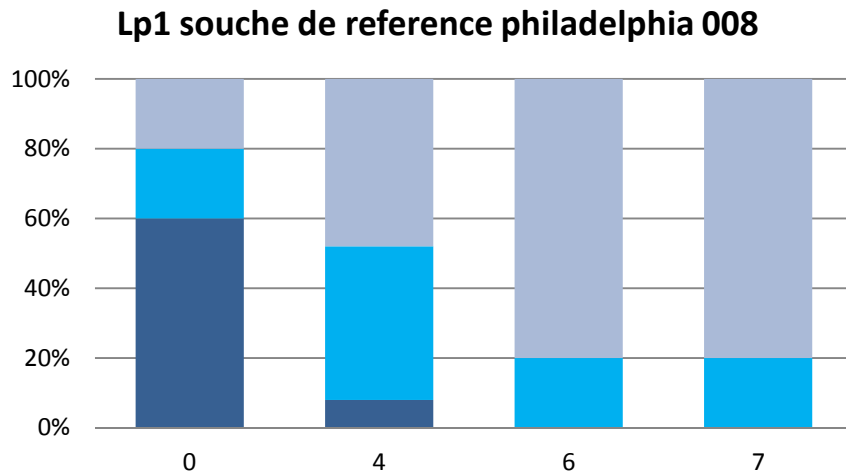


Figure 13 : Analyse par cytométrie en flux des formes physiologiques de Lp1-008 référence, Lp1-044 clinique et Lp1-RNN environnementale après des traitements au dioxyde de chlore de 0, 4, 6, 7 mg/L pendant 60 min à température ambiante. Les bactéries ont été visualisées sur un tracé de points de fluorescence rouge PI (FL3) par rapport à la fluorescence verte SYTO 9 (FL1). La région R1 correspond à des cellules mortes. La région R2 correspond aux cellules viables et cultivables (VC). La région R3 (cellules VBNC) correspond à des bactéries dans un état intermédiaire avec des membranes compromises.

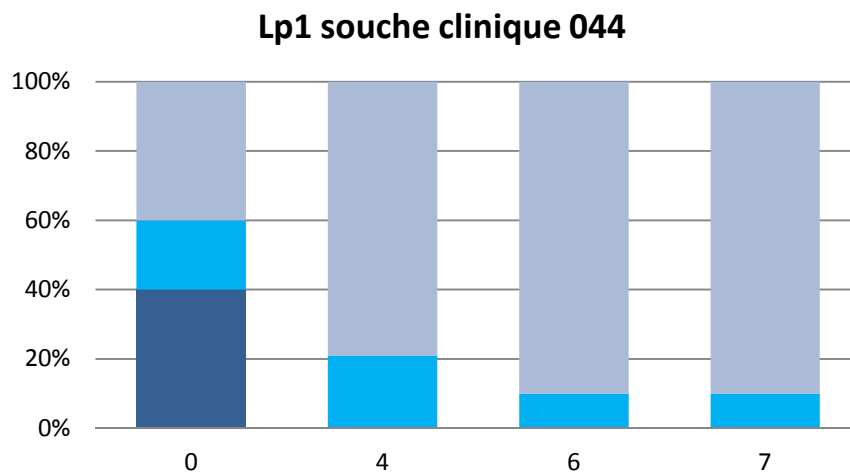
Les cytogrammes nous permettent de définir les proportions de chaque population pour chaque souche après les différents stress au dioxyde de chlore. Ainsi les formes DC

(région R1) vont augmenter de 25 % (sans traitement) à 57 % (traitement par 7 mg/L ClO₂), de 40 % à 90 % et de 20 % à 80 % respectivement pour les souches Lp1-RNN environnementale, Lp1-044 clinique et Lp1-008 référence. Les pourcentages des formes VC (région R2) vont diminuer respectivement de 50 % pour la souche Lp1-RNN environnementale, 40 % pour la souche Lp1-044 clinique et 60 % pour la souche Lp1-008 référence pour atteindre des seuils non détectables dès 4 mg/L de ClO₂. Les pourcentages des formes VBNC (région R3) vont fluctuer entre 25 % et 55%, 20% et 10% et 20% et 47 % respectivement pour la souche Lp1-RNN environnementale, Lp1-044 clinique et Lp1-008 référence.

A



B



C

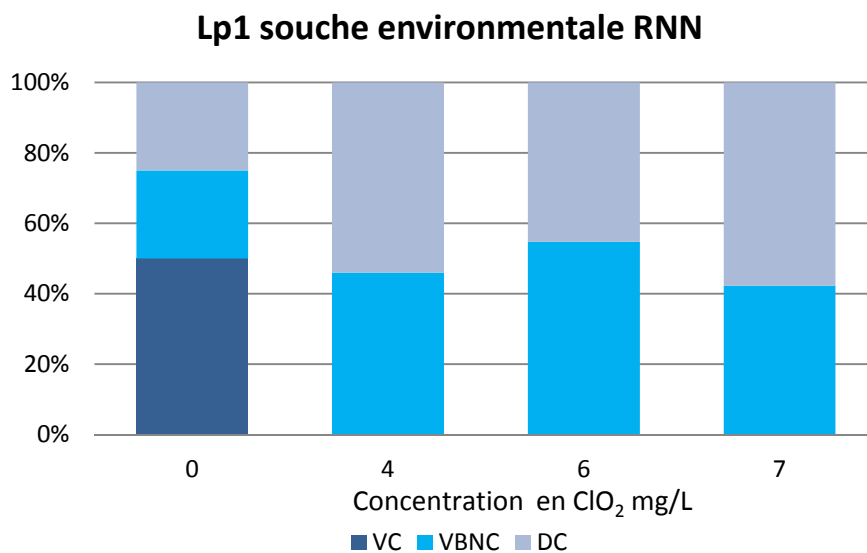


Figure 14 : Répartition des cellules viables cultivables (VC), cellules cultivables non viables (VBNC) et les cellules mortes (DC) observées après des traitements de choc au dioxyde de chlore à 0, 4, 6 et 7 mg/L pendant 60 min à température ambiante. Les pourcentages des différentes formes ont été déterminés à l'aide de la cytométrie en flux comme décrit précédemment (Allegra et al. 2008). Les profils représentés sont la moyenne de 3 expériences séparées. A: souche de référence philadelphia 008; B : souche clinique 044 et C : souche environnementale RNN.

Les mêmes proportions de formes VC, VBNC, et DC ont été retrouvées quand les souches n'ont subi aucun traitement comme lors des expériences menées sur le traitement thermique. La figure 13, représentant l'état physiologique des 3 souches, montre qu'un traitement à une concentration de 4 mg/L a induit la perte de culture sur milieu BCYE pour les souches Lp1-RNN environnementale et Lp1-044 clinique alors qu'une concentration supérieure est nécessaire pour avoir les mêmes effets sur la souche Lp1-008 référence. Or ces concentrations ne pourraient pas être mises en œuvre pour la désinfection des réseaux ou des TAR par exemple. Pour des concentrations de 6 mg/L et plus, aucune forme de VC n'est détectée par cytométrie ou par culture. Mais les proportions des formes VBNC et DC diffèrent en fonction des souches. Le nombre de VBNC de la souche clinique Lp1-044 clinique diminue lorsque la concentration en chlore augmente (de 20% à 10%) alors que pour les deux autres souches, il semble que les formes VBNC augmentent après une exposition à 4 mg/L avant de décroître à un niveau basal (50% à 20%) pour la souche Lp1-008 référence ou de rester dans des proportions constante (45-55%) pour Lp1-RNN environnementale. Le traitement au dioxyde de chlore semble avoir des effets comparables sur la présence de formes de légionelles que le traitement thermique.

2.2 Co-culture *Legionella*- *Acantamoeba polyphaga*

Les études menées sur les formes VBNC des légionelles montrent que certaines souches peuvent être revivifiées après culture sur tapis amibien (Allegra et al. 2008, Steinert et al. 1997). Nous avons montré précédemment qu'après un choc thermique de 30 min à 70°C la souche Lp1-044 clinique n'était pas capable de croître sur milieu de culture alors que les deux autres souches, dans des conditions données, retrouvaient cette capacité de développement sur BCYE. Nous avons donc choisi d'étudier le comportement de nos trois souches après des chocs au dioxyde de chlore de 4, 6 et 7 mg/L en culture avec des amibes *A. polyphaga* pendant 4 jours à 30°C à une MOI de 10.

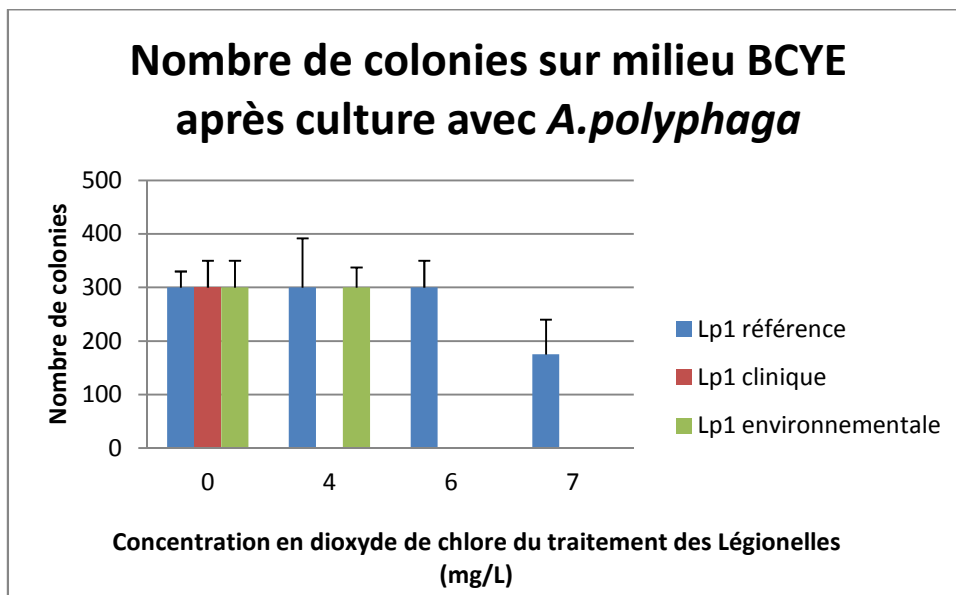


Figure 15 : Colonies dénombrées sur milieux BCYE après co-culture de 4 jours à 30°C de *L. pneumophila* et *A. polyphaga* (MOI 10). Les souches ont été traitées par 0, 4, 6, 7 mg/L de dioxyde de chlore pendant 60 min à température ambiante avant la co-culture.

Les contrôles positif (0 mg/L ClO₂) confirment une fois de plus la capacité de la légionelle à entrer dans la cellule, à se multiplier et à lyser son hôte.

Par contre après traitement au dioxyde de chlore, les résultats semblent montrer que les souches vont évoluer indépendamment les unes des autres. La souche Lp1-008 référence est capable de croître sur milieu de culture quel que soit le traitement appliqué. Par contre la souche Lp1-044 clinique n'a jamais pu être cultivée sur BCYE. Quant à la souche Lp1-RNN environnementale, au-delà d'une concentration de 4 mg/L de ClO₂, aucune colonie n'a pu être détectée sur milieu de culture.

2.3 Co-culture *Legionella*-Macrophage-like ou cellules épithéliales

Les formes VBNC présentes après un traitement de 30 min à 70°C ne semblent pas capables d'infecter les macrophages-like. Nous avons donc voulu savoir comment les formes VBNC présentes après traitement au dioxyde de chlore se comportaient lorsqu'elles étaient cultivées en présence de cellules. Les trois souches ont donc été traitées par 4, 6 et 7 mg/L de ClO₂ pendant une heure à température ambiante puis cultivées sur tapis de cellules macrophagiques ou de cellules épithéliales alvéolaires à une MOI de 1. Après une incubation de 4 jours à 37°C, 5% CO₂ les cellules ont été lysées et les surnageants ont été, pour partie, analysés par cytométrie en flux et étalés sur milieu BCYE. Après 10 jours d'incubation à

37°C, aucune colonie n'a été observée sur boîte de culture ce qui a conforté les analyses de cytométrie en flux. Les contrôles positifs (sans traitement) ont confirmé le pouvoir pathogène des légionelles envers les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires (Furugen et al. 2008, Stone et al. 1999). Les résultats montrent que les formes VBNC présentes après un choc au dioxyde de chlore ne sont pas revivifiables en présence de macrophages et donc ne semblent pas être infectieuses. Les premiers résultats de culture avec des cellules épithéliales alvéolaires semblent indiquer que les formes VBNC ne sont pas non plus capables d'infecter et de se multiplier au sein de leur hôte et ne retrouvent pas la propriété de croître sur milieu BCYE. Cependant ces données doivent être confirmées par d'autres expériences.

V. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L. pneumophila est la bactérie responsable de la légionellose, une pneumopathie qui se transmet par les aérosols. Afin de prévenir toute épidémie, les réseaux d'eaux chaudes sanitaires des bâtiments ouverts au public sont soumis à des contrôles stricts. En France, et dans ce contexte, la concentration de *L. pneumophila* ne doit pas dépasser 1000 UFC/L, au-delà des méthodes de décontamination doivent être mises en place (DGS 2002, WHO 2004) dont le traitement par choc thermique ou chloré. Malheureusement ces méthodes de décontamination s'avèrent peu efficaces dans le temps puisque la bactérie « utilise » les microorganismes présents dans les réseaux pour se protéger. Les biofilms et/ou les amibes deviennent alors de véritables barrières de protection face aux traitements. De plus les travaux précédents ont montré que certains traitements entraînaient la perte de croissance sur milieu gélosé de plusieurs souches de *L. pneumophila* (Allegra et al. 2008) et généraient l'apparition de formes VBNC (Allegra et al. 2011b). Cet état particulier de la bactérie suscite de nombreuses interrogations et n'est pas encore clairement caractérisé.

Dans ce contexte les objectifs de nos travaux étaient :

- d'étudier le profil physiologique de 3 souches de *L. pneumophila* différentes et d'analyser leur profil lorsqu'elles sont soumises soit à un choc thermique, soit à un choc oxydant (dioxyde de chlore).
- d'évaluer le pouvoir infectieux des formes VBNC présentes après ces chocs contre leurs cellules cibles.

La première partie de nos travaux a été basée sur l'impact des traitements thermique et au dioxyde de chlore sur la formation de formes VBNC de *L. pneumophila*.

Les résultats obtenus après l'étude de ces trois souches ont confirmé qu'à l'état initial (non traité) plusieurs formes coexistaient. Les formes viables cultivables, les formes viables non cultivables et les mortes.

Les deux traitements utilisés au cours de l'étude de ces trois souches de *L. pneumophila* montrent que chaque souche va répondre de manière différente en fonction du stress proposé. La souche de référence Lp1-008 référence Philadelphia garde une proportion sensiblement constante de formes VBNC de l'ordre de 20% quel que soit le stress subit. De plus ces formes VBNC peuvent être revivifiées après culture en présence d'*A. polyphaga*.

Les deux autres souches semblent réagir de manières différentes en fonction du choc imposé. La présence de formes VBNC de la souche clinique, Lp1-044 clinique, va augmenter au cours du traitement thermique et atteindre des proportions allant de 20 à 40% lors d'un

choc à 70°C alors que les formes VBNC vont diminuer de 20 à 10% lors d'une exposition au dioxyde de chlore à 4, 6 et 7 mg/L.

La souche environnementale, Lp1-RNN environnementale, semble évoluer à l'opposé, la proportion des formes VBNC reste constante lors du choc thermique à 70°C pendant 5, 10 et 30 min (de l'ordre de 15%) puis celles-ci disparaissent après 60 min de traitement. Après traitement au dioxyde de chlore la proportion des formes VBNC augmente de 25% à 35% lors d'une exposition au dioxyde de chlore à 4, 6 et 7 mg/L.

Ces états physiologiques différents montrent qu'il est impossible sur ces critères (comme pour d'autres) d'assimiler le comportement d'une souche à une espèce (comme *L. pneumophila*). Chaque souche s'adapte et possède des propriétés et capacités de réponses propres. Les différents comportements de ces souches, après un stress, peuvent être dus à leur origine différente ce qui a pu engendrer des adaptations différentes. Les trois souches de *L. pneumophila* ont évolué dans des milieux et des conditions différentes avant d'être utilisées dans nos essais. Les différents facteurs de stress auxquels elles ont été alors exposées ont induit la forme VBNC chez certaines souches et ainsi contribué à une augmentation de leur résistance face aux traitements, à l'exemple des formes VBNC de *V. vulnificus* étant capables de résister à des traitements potentiellement létaux (Nowakowska and Oliver 2013).

Ces réponses différentes nous ont amené à étudier si les formes VBNC présentes ou générées après un stress pouvaient être revivifiées après culture sur amibes ou cellules. Nous avons décidé de tester la capacité d'infection des formes VBNC, générées après choc thermique, contre des cellules « macrophage-like » et des cellules épithéliales alvéolaires. En effet, (i) les formes non stressées de *L. pneumophila* sont capables d'infecter des cellules eucaryotiques (particulièrement les macrophages pulmonaires) (Messi et al. 2013, Steinert et al. 2007) et l'infection de cellules épithéliales alvéolaires de rat a aussi été documentée (Mody et al. 1993); et (ii) ces mêmes formes cultivées préalablement sur amibes sont plus infectieuses pour les épithéliales alvéolaires (Cirillo et al. 1994).

Nous avons d'abord focalisé notre étude sur les formes VBNC présentes après un choc thermique de 70°C pendant 30 min, selon la norme de décontamination des réseaux d'eaux chaudes sanitaires (WHO 2004). Aucune des formes VBNC n'a été retrouvée après culture en présence de macrophage-like ou de cellules épithéliales alvéolaires, ce qui semble indiquer que ces formes VBNC ne sont pas capables d'infecter les cellules immunitaires. Des résultats similaires ont été décrits pour les formes VBNC de *L. monocytogenes* qui ne sont pas

virulentes en présence de cellules HT-29 (Lindback et al. 2010). Alors que les formes VBNC de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *E. coli*, *S. flexneri* et *S. enterica* ont été revivifiées par co-culture avec différentes cellules eucaryotes (Senoh et al. 2010).

Lorsque les formes VBNC ont été cultivées en présence d'amibes, des différences entre les souches ont été observées. Les souches Lp1-008 référence et Lp1-RNN environnementale ont été revivifiées lors d'une incubation à 30°C à une MOI de 10 alors que la souche Lp1-044 clinique n'a jamais pu être re-cultivée sur milieu BCYE. Une des hypothèses de cette non revivification peut être le fait que les amibes ne sont pas toutes permissives de la même manière vis à vis des souches de *L. pneumophila* puisque ceci a été décrit dans la littérature (Dey et al. 2009). Nos résultats le suggèrent donc aussi relativement aux VBNC générées par choc thermique.

Une autre hypothèse peut être la présence de VBNC nouvellement formées. En effet Lp1-044 clinique est la seule souche pour laquelle la proportion de formes VBNC a augmenté, impliquant peut être la formation de « nouvelles » formes VBNC qui ne seraient alors pas encore capables d'infecter les amibes. Ainsi la co-existence de plusieurs stades d'évolution de formes VBNC ne peut être exclue, ceci en fonction des stress environnementaux auxquels les souches doivent faire face, lesquelles pourraient ainsi exprimer plusieurs facteurs génétiques de « protection », de retour à l'état cultivable ou de pathogénicité. A ce jour aucun outil permettant de discriminer des formes VBNC préexistantes des formes VBNC « nouvellement » générées n'est disponible.

Nos études ont principalement porté sur l'impact d'un choc thermique de 70°C durant 30 min selon la législation en vigueur pour la décontamination des réseaux d'adduction d'eau. Mais nous nous sommes aussi questionnés quant à l'impact de températures plus faibles sur la présence (ou l'apparition) de formes VBNC de *L. pneumophila*.

En effet, si l'on considère que des températures supérieures à 60°C sont très difficiles à atteindre aux points d'usages dans les bâtiments à larges réseaux, et que des formes VBNC y sont générées, la pertinence des recommandations de l'OMS pourrait être remise en question. En particulier si l'on admet que certaines VBNC sont susceptibles d'être pathogènes après interactions avec des amibes. D'autant plus que la présence d'amibes capables de survivre après des chocs thermiques à 70°C a été démontrée dans certains réseaux. Ainsi, si nous voulions extrapoler nos résultats aux installations humaines, la présence d'amibes dans les réseaux pourrait favoriser la revivification des VBNC de *L. pneumophila* générées après choc thermique conduisant possiblement à certains cas de légionellose nosocomiale.

Par ailleurs, il est connu que lorsque *L. pneumophila* est exposée à un stress nutritionnel, celle-ci passe d'un état répliatif non mobile à un état transmissif mobile exprimant des facteurs de virulence. Si nous voulions extrapoler ceci à l'impact d'un stress thermique, les formes VBNC pourraient être plus infectantes que celles n'ayant subi aucun stress.

Nous serions ainsi tentés de spéculer sur le fait que pour *L. pneumophila* (comme c'est probablement le cas pour d'autres bactéries non sporulantes) que le passage à l'état VBNC est une stratégie de survie, lorsque le retour à l'état cultivable est possible, laquelle est efficace jusqu'au point où les dommages cellulaires deviennent trop importants pour être réversibles. Considérant que (i) la plupart des écosystèmes aquatiques sont oligotrophes et (ii) la difficulté d'isoler les légionelles depuis de tels environnements par les méthodes traditionnelles de culture, nous pensons que les formes VBNC de légionelles y sont largement répandues.

La seconde partie a consisté à déterminer les concentrations de ClO₂ permettant de négativer la culture sur BCYE et à étudier si les formes VBNC présentes ou générées après des chocs au dioxyde de chlore à 4, 6 et 7 mg/L pouvaient être revivifiées après culture sur cellules. Les résultats de culture sur tapis macrophage-like ou de cellules épithéliales alvéolaires ont montré qu'aucune souche n'était capable de croître à nouveau sur milieu BCYE.

D'après ces données, il semble que les formes VBNC présentes ou générées après des traitements thermiques ou chlorés ne soient pas capables de se multiplier à l'intérieur des macrophages ou des cellules épithéliales alvéolaires. Nos résultats ainsi que des études antérieures, ont montré que certaines *L. pneumophila* VBNC, sous certaines conditions, sont capables de se multiplier au sein des amibes (Allegra et al. 2008, Alleron et al. 2008, Steinert et al. 1997).

Nous avons donc ensuite évalué le pouvoir infectieux de ces formes VBNC (souches Lp1-008 référence et Lp1-RNN environnementale) après un traitement thermique de 70°C pendant 30 min, après culture en présence d'amibes puis en présence de cellules macrophage-like. Les résultats ont montré que les formes VBNC présentes sont revivifiées après culture sur amibes et sont alors capables d'infecter les macrophages. Ces derniers résultats montrent donc que les formes VBNC ne semblent pas pathogènes pour les cellules de l'immunité mais

que la culture en présence d'amibe leur permettrait de retrouver la faculté de pénétrer à l'intérieur des cellules pour s'y multiplier.

Une revivification préalable des *L. pneumophila* VBNC de la souche clinique et de la souche environnementale serait-elle nécessaire à ces souches pour permettre l'infection des cellules de type macrophage. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour les espèces de *L. monocytogenes* et de *V. harveyi* (Cappelier et al. 2007, Sun et al. 2008) Les formes VBNC de ces bactéries doivent être revivifiées afin de retrouver leur pouvoir pathogène et plus particulièrement sur œuf embryonné de poulet pour *L. monocytogenes*.

Les légionelles VBNC présentes après un choc thermique (sous certaines conditions) retrouvent donc ainsi leur pouvoir pathogène après avoir été cultivées en présence d'amibes. Puisque la désinfection des réseaux par la méthode de traitement thermique semble avoir une efficacité limitée dans le temps (Allegra et al. 2011a), il est probable que le traitement thermique au sein des réseaux génère des VBNC potentiellement pathogènes. Ceci tendrait à expliquer la présence de cas de légionellose en l'absence de résultats positifs par culture.

Nos résultats actuels ainsi que des études publiées antérieurement montrent que *Legionella spp.* peut survivre dans un état VBNC dans les systèmes d'eau, malgré l'utilisation d'un processus de désinfection thermique ou chloré,. Cela n'exclut pas l'influence d'autres paramètres environnementaux tels que la présence d'un biofilm ou des kystes amibiens qui protègent les souches de *Legionella* dans de tels systèmes. Enfin, compte tenu de nos résultats sur l'infection de cellules de type macrophage par des formes VBNC traitées thermiquement et revivifiées par *A. polyphaga*, il semble intéressant de réaliser ces expériences sur les cellules épithéliales alvéolaires. De manière identique, l'évaluation du pouvoir infectieux des formes VBNC induites par le dioxyde de chlore et revivifiées par *A. polyphaga* sur les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires semble nécessaire.

Il pourrait être intéressant de savoir si ces formes VBNC peuvent être revivifiées sur des cellules issues de cultures primaires (monocytes isolés à partir de cellules mononuclées du sang périphérique par exemple) ou si d'autres protozoaires, connus pour soutenir la croissance de *L. pneumophila*, peuvent également être des facteurs de revivification des formes VBNC.

Il pourrait être aussi intéressant de tester la pathogénicité de ces formes VBNC sur des cobayes par la diffusion d'aérosols.

VI. TRAVAUX COMPLEMENTAIRES

Nous avons pu, au cours de notre thèse, nous impliquer dans d'autres travaux associés à la détection de *L. pneumophila* par d'autres approches que celles décrites à ce jour. Nous avons ainsi participé à la mise au point de différentes variantes d'un immuno-capteur à *L. pneumophila* (utilisant ainsi un anticorps monoclonal préalablement caractérisé par l'équipe).

Ainsi :

- un capteur à onde évanescente à excitation par réseau et immobilisation d'une monocouche d'anticorps sur guide en oxyde d'hafnium (HfO₂) pour la capture et le suivi de la concentration de *L. pneumophila* dans des échantillons environnementaux a été investigué en collaboration avec le laboratoire H. Curien (UMR CNRS 5516) de l'Université Jean Monnet et le laboratoire Centre Ingénierie Santé (CIS) de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint Etienne. Au cours de cette thèse, j'ai donc eu l'opportunité de continuer mes recherches initialement engagées (contrat d'ingénieur de recherche préalable à la thèse) concernant la mise au point du micro-biocapteur pour l'immuno-détection en temps réel de *L. pneumophila* (projet ANSES 2008-2010), décrit ci-dessus. Le but étant de développer un micro-biocapteur capable d'analyser en temps réel la proportion de cellules minoritaires (légionelles) en suspension dans une population complexe (comme dans les échantillons environnementaux pluri-microbiens). L'analyse doit porter sur de grands volumes (eau et air), et tenir compte des cinétiques de capture et de la morphologie des cellules. L'objectif étant de mettre au point une méthode de détection rapide, reproductible et utilisable comme « outil d'alerte » afin d'évaluer la présence des *L. pneumophila* à partir d'échantillons environnementaux d'origines variées (eau chaude sanitaire, aérosols). L'analyse des aérosols est particulièrement pertinente compte-tenu des récents épisodes de légionelloses associés à des procédés de dispersion de panaches contaminés (épidémie de Harnes notamment (Nguyen et al. 2006)). Le but ultime est notamment d'échantillonner des aérosols générés par les tours aéro-réfrigérantes et les stations de traitement des eaux résiduaires afin d'évaluer le risque d'exposition à *Legionella*.

La technologie repose sur la capture de cellules marquées par des récepteurs biologiques spécifiques, ici des anticorps anti-LPS spécifique de *L. pneumophila* sg1, fixés sur un support plan en quartz recouvert par une fine couche d'oxyde métallique. Il associe un montage fluïdique (géométrie, rhéodynamique) adapté à des milieux de particules hétérogènes en suspension (liquides biologiques), une couche bio/chimio-sélective, un transducteur composé d'un guide d'onde optique (avec source d'excitation) et d'une caméra numérique haute résolution (mesure des émissions de fluorescence). Les cellules capturées seront caractérisées

par leur émission de fluorescence et les cinétiques réactionnelles associées par un logiciel d'analyse original.

La liste relative à la valorisation de ces travaux est disponible dans la section publications et communications de cette thèse.

- deux variantes de capteur impédimétrique (différentes fonctionnalisations des surfaces des électrodes employées) ont également été testées pour leur capacité à détecter *L. pneumophila*. Ces travaux ont été menés dans le cadre d'un partenariat avec le Laboratoire des Interfaces et Matériaux Avancés, Université de Monastir, Tunisie (Projet COOPERA 2011 et PHC Utique 2011-2014). Les travaux réalisés notamment sur la seconde version du capteur impédimétrique démontrent la possibilité de détection de *L. pneumophila* sous leur forme VBNC (publication soumise).

La liste relative à la valorisation de ces travaux est disponible dans la section publications et communications de cette thèse.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D.E. and Guyard, C. (2013) Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. International journal of molecular sciences 14(11), 21660-21675.
- Abu-Zant, A., Santic, M., Molmeret, M., Jones, S., Helbig, J. and Abu Kwaik, Y. (2005) Incomplete activation of macrophage apoptosis during intracellular replication of *Legionella pneumophila*. Infection and immunity 73(9), 5339-5349.
- Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Stone, B.J., Venkataraman, C. and Harb, O.S. (1998) Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. Applied and environmental microbiology 64(9), 3127-3133.
- Adams, B.L., Bates, T.C. and Oliver, J.D. (2003) Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. Applied and environmental microbiology 69(12), 7462-7466.
- 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. Emerging infectious diseases 2(3), 225-230.
- Adeleke, A.A., Fields, B.S., Benson, R.F., Daneshvar, M.I., Pruckler, J.M., Ratcliff, R.M., Harrison, T.G., Weyant, R.S., Birtles, R.J., Raoult, D. and Halablab, M.A. (2001) *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. International journal of systematic and evolutionary microbiology 51(Pt 3), 1151-1160.
- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H. and Glaser, G. (1996) An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(12), 6059-6063.
- Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C. and Buchrieser, C. (2007) *Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. Cellular and molecular life sciences : CMLS 64(4), 432-448.
- Alfred B. Cunningham, J.E.L., and Rockford J. Ross (2008) Biofilm processes.
- Allegra, S., Berger, F., Berthelot, P., Grattard, F., Pozzetto, B. and Riffard, S. (2008) Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. Applied and environmental microbiology 74(24), 7813-7816.
- Allegra, S., Girardot, F., Grattard, F., Berthelot, P., Helbig, J.H., Pozzetto, B. and Riffard, S. (2011a) Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve *Legionella pneumophila* serogroup 1 recovery from environmental samples. Journal of applied microbiology.
- Allegra, S., Grattard, F., Girardot, F., Riffard, S., Pozzetto, B. and Berthelot, P. (2011b) Longitudinal evaluation of the efficacy of heat treatment procedures against *Legionella spp.* in hospital water systems by using a flow cytometric assay. Applied and environmental microbiology 77(4), 1268-1275.
- Alleron, L., Khemiri, A., Koubar, M., Lacombe, C., Coquet, L., Cosette, P., Jouenne, T. and Frere, J. (2013) VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. Water research.

- Alleron, L., Merlet, N., Lacombe, C. and Frere, J. (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Current microbiology* 57(5), 497-502.
- Bartram, J. (2007) *Legionella* and the prevention of legionellosis, World Health Organization.
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H. and Atlas, R.M. (1991) Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Applied and environmental microbiology* 57(2), 597-600.
- Berk, S.G., Ting, R.S., Turner, G.W. and Ashburn, R.J. (1998) Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Applied and environmental microbiology* 64(1), 279-286.
- Besnard, V., Federighi, M., Declercq, E., Jugiau, F. and Cappelier, J.M. (2002) Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Veterinary research* 33(4), 359-370.
- Bigot, R., Bertaux, J., Frere, J. and Berjeaud, J.M. (2013) Intra-amoeba multiplication induces chemotaxis and biofilm colonization and formation for *Legionella*. *PloS one* 8(10), e77875.
- Birtles, R.J., Harrison, T.G., Samuel, D. and Taylor, A.G. (1990) Evaluation of urinary antigen ELISA for diagnosing *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection. *Journal of clinical pathology* 43(8), 685-690.
- Blanc, D.S., Carrara, P., Zanetti, G. and Francioli, P. (2005) Water disinfection with ozone, copper and silver ions, and temperature increase to control *Legionella*: seven years of experience in a university teaching hospital. *The Journal of hospital infection* 60(1), 69-72.
- Blazquez, R.M., Espinosa, F.J., Martinez-Toldos, C.M., Alemany, L., Garcia-Orenes, M.C. and Segovia, M. (2005) Sensitivity of urinary antigen test in relation to clinical severity in a large outbreak of *Legionella pneumonia* in Spain. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 24(7), 488-491.
- Bollin, G.E., Plouffe, J.F., Para, M.F. and Hackman, B. (1985) Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Applied and environmental microbiology* 50(5), 1128-1131.
- Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M.H. and Hechard, Y. (2007) Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environmental microbiology* 9(5), 1341-1344.
- Bovill, R.A. and Mackey, B.M. (1997) Resuscitation of 'non-culturable' cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 143 (Pt 5), 1575-1581.
- Bozue, J.A. and Johnson, W. (1996) Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infection and immunity* 64(2), 668-673.
- Brieland, J.K., Fantone, J.C., Remick, D.G., LeGendre, M., McClain, M. and Engleberg, N.C. (1997) The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infection and immunity* 65(12), 5330-5333.

Brooks, T., Osicki, R., Springthorpe, V., Sattar, S., Fillion, L., Abrial, D. and Riffard, S. (2004) Detection and identification of *Legionella* species from groundwaters. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 67(20-22), 1845-1859.

Bruckert, W.M. and Abu Kwaik, Y. (2014) Complete and Ubiquitinated Proteome of the *Legionella*-Containing Vacuole within Human Macrophages. *Journal of proteome research*.

Byrd, J.J., Xu, H.S. and Colwell, R.R. (1991) Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Applied and environmental microbiology* 57(3), 875-878.

Campèse, C., Jarraud, S., Bitar, D., Maine, C. and Che, D. (2005) Les légionelloses survenues en France en 2004.

Cappelier, J.M., Besnard, V., Roche, S., Garrec, N., Zundel, E., Velge, P. and Federighi, M. (2005) Avirulence of viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* cells demonstrated by in vitro and in vivo models. *Veterinary research* 36(4), 589-599.

Cappelier, J.M., Besnard, V., Roche, S.M., Velge, P. and Federighi, M. (2007) Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. *Veterinary research* 38(4), 573-583.

Carvalho, F.R., Nastasi, F.R., Gamba, R.C., Foronda, A.S. and Pellizari, V.H. (2008) Occurrence and diversity of *Legionellaceae* in polar lakes of the Antarctic peninsula. *Current microbiology* 57(4), 294-300.

Casari, E., Ferrario, A. and Montanelli, A. (2007) Prolonged effect of two combined methods for *Legionella* disinfection in a hospital water system. *Annali di igiene : medicina preventiva e di comunita* 19(6), 525-532.

Casati, S., Conza, L., Bruin, J. and Gaia, V. (2010) Compost facilities as a reservoir of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16(7), 945-947.

Cawthorn, D.M. and Witthuhn, R.C. (2008) Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *Journal of applied microbiology* 105(4), 1178-1185.

Cazalet, C., Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Lomma, M., Dervins-Ravault, D., Newton, H.J., Sansom, F.M., Jarraud, S., Zidane, N., Ma, L., Bouchier, C., Etienne, J., Hartland, E.L. and Buchrieser, C. (2010) Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLoS genetics* 6(2), e1000851.

Charpentier, X., Gabay, J.E., Reyes, M., Zhu, J.W., Weiss, A. and Shuman, H.A. (2009) Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by *Legionella pneumophila*. *PLoS pathogens* 5(7), e1000501.

Chen, N.T. and Chang, C.W. (2010) Rapid quantification of viable *legionellae* in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. *Journal of applied microbiology* 109(2), 623-634.

Cheng, Y.W., Chan, R.C. and Wong, P.K. (2007) Disinfection of *Legionella pneumophila* by photocatalytic oxidation. *Water research* 41(4), 842-852.

- Ciesielski, C.A., Blaser, M.J. and Wang, W.L. (1986) Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infection and immunity* 51(2), 397-404.
- Cirillo, J.D., Falkow, S. and Tompkins, L.S. (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infection and immunity* 62(8), 3254-3261.
- Colwell, R.R. (2000) Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 6(2), 121-125.
- Conza, L., Pagani, S.C. and Gaia, V. (2013) Presence of *Legionella* and free-living *Amoebae* in composts and bioaerosols from composting facilities. *PLoS one* 8(7), e68244.
- Cook, K.L. and Bolster, C.H. (2007) Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *Journal of applied microbiology* 103(3), 573-583.
- Cooper, I.R., White, J., Mahenthiralingam, E. and Hanlon, G.W. (2008) Long-term persistence of a single *Legionella pneumophila* strain possessing the mip gene in a municipal shower despite repeated cycles of chlorination. *The Journal of hospital infection* 70(2), 154-159.
- Costa, J., Tiago, I., da Costa, M.S. and Verissimo, A. (2005) Presence and persistence of *Legionella spp.* in groundwater. *Applied and environmental microbiology* 71(2), 663-671.
- CSTB (2012) Maîtrise du risque de développement des légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire Défaillances et préconisations.
- De Buck, E., Anne, J. and Lammertyn, E. (2007) The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology* 153(Pt 12), 3948-3953.
- Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V. and Ollevier, F. (2007) Detection of *Legionella spp.* and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water research* 41(14), 3159-3167.
- Declerck, P., Vanysacker, L., Hulsmans, A., Lambert, N., Liers, S. and Ollevier, F. (2010) Evaluation of power ultrasound for disinfection of both *Legionella pneumophila* and its environmental host *Acanthamoeba castellanii*. *Water research* 44(3), 703-710.
- Delgado-Viscogliosi, P., Solignac, L. and Delattre, J.M. (2009) Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. *Applied and environmental microbiology* 75(11), 3502-3512.
- Descours, G., Cassier, P., Forey, F., Ginevra, C., Etienne, J., Lina, G. and Jarraud, S. (2014) Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of *Legionella* species from respiratory samples. *Journal of microbiological methods* 98, 119-121.
- Dey, R., Bodennec, J., Mameri, M.O. and Pernin, P. (2009) Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*. *FEMS microbiology letters* 290(1), 10-17.
- DGS (2002) DGS/SD7A/SD5C/DHOS/E4 n° 2002/243 Prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé. Bulletin officielle de la santé.

- Dhiaf, A., Bakhrouf, A. and Witzel, K.P. (2008) Resuscitation of eleven-year VBNC *Citrobacter*. *Journal of water and health* 6(4), 565-568.
- Domingue, E.L., Tyndall, R.L., Mayberry, W.R. and Pancorbo, O.C. (1988) Effects of three oxidizing biocides on *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Applied and environmental microbiology* 54(3), 741-747.
- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* 8(9), 881-890.
- Dreux, N., Albagnac, C., Federighi, M., Carlin, F., Morris, C.E. and Nguyen-the, C. (2007) Viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state. *Journal of applied microbiology* 103(4), 1272-1281.
- Ducret, A., Chabaliere, M. and Dukan, S. (2014) Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Legionella pneumophila*. *BMC microbiology* 14(1), 3.
- Dupuy, M., Mazoua, S., Berne, F., Bodet, C., Garrec, N., Herbelin, P., Menard-Szczebara, F., Oberti, S., Rodier, M.H., Soreau, S., Wallet, F. and Hechard, Y. (2011) Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water research* 45(3), 1087-1094.
- Dusserre, E., Ginevra, C., Hallier-Soulier, S., Vandenesch, F., Festoc, G., Etienne, J., Jarraud, S. and Molmeret, M. (2008) A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *legionellae* that can recover their cultivability. *Applied and environmental microbiology* 74(15), 4817-4824.
- Eiler, A. and Bertilsson, S. (2006) Detection and quantification of *Vibrio* populations using denaturant gradient gel electrophoresis. *Journal of microbiological methods* 67(2), 339-348.
- Epalle, T., Girardot, F., Allegra, S., Maurice-Blanc, C., Garraud, O. and Riffard, S. (2014) Viable but Not Culturable Forms of *Legionella pneumophila* Generated After Heat Shock Treatment Are Infectious for Macrophage-Like and Alveolar Epithelial Cells After Resuscitation on *Acanthamoeba polyphaga*. *Microbial ecology*.
- Fakruddin, M., Mannan, K.S.B. and Andrews, S. (2013) Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN microbiology* 2013.
- Faulkner, G. and Garduno, R.A. (2002) Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *Journal of bacteriology* 184(24), 7025-7041.
- Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C. and Baine, W.B. (1979) Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *Journal of clinical microbiology* 10(4), 437-441.
- Fields, B.S. (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends in microbiology* 4(7), 286-290.
- Fields, B.S., Benson, R.F. and Besser, R.E. (2002) Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical microbiology reviews* 15(3), 506-526.
- Fittipaldi, M., Nocker, A. and Codony, F. (2012) Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of microbiological methods* 91(2), 276-289.
- Fliermans, C.B. (1983) Autecology of *Legionella pneumophila*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten*

und Parasitologie = International journal of microbiology and hygiene. A, Medical microbiology, infectiousdiseases, parasitology 255(1), 58-63.

Fliermans, C.B. (1996) Ecology of Legionella: From Data to Knowledge with a Little Wisdom. Microbial ecology 32(2), 203-228.

Franzin, L., Cabodi, D. and Fantino, C. (2002) Evaluation of the efficacy of ultraviolet irradiation for disinfection of hospital water contaminated by Legionella. The Journal of hospital infection 51(4), 269.

Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade, J.E., Shepard, C.C. and Brachman, P.S. (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. The New England journal of medicine 297(22), 1189-1197.

Fuche, F., Vianney, A., Andrea, C., Doublet, P. and Gilbert, C. (2014) Functional type 1 secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence. Journal of bacteriology.

Furugen, M., Higa, F., Hibiya, K., Teruya, H., Akamine, M., Haranaga, S., Yara, S., Koide, M., Tateyama, M., Mori, N. and Fujita, J. (2008) *Legionella pneumophila* infection induces programmed cell death, caspase activation, and release of high-mobility group box 1 protein in A549 alveolar epithelial cells: inhibition by methyl prednisolone. Respiratory research 9, 39.

Garcia, M.T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R.D. and Abu Kwaik, Y. (2007) *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. Environmental microbiology 9(5), 1267-1277.

Gast, R.J., Moran, D.M., Dennett, M.R., Wurtsbaugh, W.A. and Amaral-Zettler, L.A. (2011) Amoebae and *Legionella pneumophila* in saline environments. Journal of water and health 9(1), 37-52.

Geesey, G.G., Wigglesworth-Cooksey, B. and Cooksey, K.E. (2000) Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: A review. Biofouling 15(1-3), 195-205.

Giao, M.S., Wilks, S.A., Azevedo, N.F., Vieira, M.J. and Keevil, C.W. (2009) Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable *Legionella pneumophila*. Microbial ecology 58(1), 56-62.

Gin, K.Y. and Goh, S.G. (2013) Modeling the effect of light and salinity on viable but non-culturable (VBNC) *Enterococcus*. Water research 47(10), 3315-3328.

Gowani, S.A., Kumar, A., Arora, S. and Lahiri, B. (2013) *Legionella pneumonia* complicated by myocarditis and torsades de pointes: A case report and review of literature. Connecticut medicine 77(6), 331-334.

Grey, B. and Steck, T.R. (2001) Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition. Applied and environmental microbiology 67(11), 5325-5327.

Hammer, B.K., Tateda, E.S. and Swanson, M.S. (2002) A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. Molecular microbiology 44(1), 107-118.

HCSP (2013) Risque lié aux légionelles Guide d'investigation et d'aide à la gestion.

- Hebert, G.A., Moss, C.W., McDougal, L.K., Bozeman, F.M., McKinney, R.M. and Brenner, D.J. (1980) The rickettsia-like organisms TATLOCK (1943) and HEBA (1959): bacteria phenotypically similar to but genetically distinct from *Legionella pneumophila* and the WIGA bacterium. *Annals of internal medicine* 92(1), 45-52.
- Heim, S., Lleo, M., Bonato, B., Guzman, C.A. and Canepari, P. (2002) The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *Journal of bacteriology* 184(23), 6739-6745.
- Helbig, J.H., Jacobs, E. and Luck, C. (2012) *Legionella pneumophila* urinary antigen subtyping using monoclonal antibodies as a tool for epidemiological investigations. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 31(7), 1673-1677.
- Helbig, J.H., Kurtz, J.B., Pastoris, M.C., Pelaz, C. and Luck, P.C. (1997) Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *Journal of clinical microbiology* 35(11), 2841-2845.
- Hlady, W.G., Mullen, R.C., Mintz, C.S., Shelton, B.G., Hopkins, R.S. and Daikos, G.L. (1993) Outbreak of Legionnaire's disease linked to a decorative fountain by molecular epidemiology. *American journal of epidemiology* 138(8), 555-562.
- Hosein, I.K., Hill, D.W., Tan, T.Y., Butchart, E.G., Wilson, K., Finlay, G., Burge, S. and Ribeiro, C.D. (2005) Point-of-care controls for nosocomial legionellosis combined with chlorine dioxide potable water decontamination: a two-year survey at a Welsh teaching hospital. *The Journal of hospital infection* 61(2), 100-106.
- Hussong, D.C., R. R. ; O'Brien, M. ; Weiss, E. ; Pearson, A. D. ; Weiner, R. M. ; Burge, W. D (1987) Viable *Legionella Pneumophila* Not Detectable by Culture on Agar Media. *Bio-technology* 5(9), 3.
- INVS (2014) Institut de Veille Sanitaire. Données de surveillance 2013-2014.
- Jakubek, D., Guillaume, C., Binet, M., Leblon, G., DuBow, M. and Le Brun, M. (2013) Susceptibility of Legionella strains to the chlorinated biocide, monochloramine. *Microbes and environments / JSME* 28(3), 336-345.
- JORF (2010) Arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire. 33, 2276.
- Joseph, S.J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C.A. and Janssen, P.H. (2003) Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and environmental microbiology* 69(12), 7210-7215.
- Kana, B.D. and Mizrahi, V. (2010) Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. *FEMS immunology and medical microbiology* 58(1), 39-50.
- Kashuba, A.D. and Ballow, C.H. (1996) Legionella urinary antigen testing: potential impact on diagnosis and antibiotic therapy. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 24(3), 129-139.
- Khweek, A.A. and Amer, A. (2010) Replication of Legionella Pneumophila in Human Cells: Why are We Susceptible? *Frontiers in microbiology* 1, 133.
- Kilvington, S. and Price, J. (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *Journal of applied bacteriology* 68(5), 519-525.

- Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A. and Kendall, A.M. (2002) Literature review--efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water research* 36(18), 4433-4444.
- Kimura, S., Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Miyairi, S., Gotoh, N., Ishiguro, M. and Yamaguchi, K. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* Las quorum sensing autoinducer suppresses growth and biofilm production in *Legionella* species. *Microbiology* 155(Pt 6), 1934-1939.
- Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N. (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian journal of microbiology* 25(3), 415-420.
- Koide, M., Saito, A., Okazaki, M., Umeda, B. and Benson, R.F. (1999) Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting soils in Japan. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 29(4), 943-944.
- Kool, J.L., Carpenter, J.C. and Fields, B.S. (1999) Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease. *Lancet* 353(9149), 272-277.
- Korhonen, L.K. and Martikainen, P.J. (1991) Survival of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in untreated and filtered lake water. *The Journal of applied bacteriology* 71(4), 379-382.
- La Scola, B., Birtles, R.J., Greub, G., Harrison, T.J., Ratcliff, R.M. and Raoult, D. (2004) *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54(Pt 3), 699-703.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D. and Faucher, S.P. (2014) The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology* 5, 258.
- Lin, Y.S., Stout, J.E., Yu, V.L. and Vidic, R.D. (1998) Disinfection of water distribution systems for *Legionella*. *Seminars in respiratory infections* 13(2), 147-159.
- Lindback, T., Rottenberg, M.E., Roche, S.M. and Rorvik, L.M. (2010) The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Veterinary research* 41(1), 8.
- Lindsay, D.S., Brown, A.W., Brown, D.J., Pravinkumar, S.J., Anderson, E. and Edwards, G.F. (2012) *Legionella longbeachae* serogroup 1 infections linked to potting compost. *Journal of medical microbiology* 61(Pt 2), 218-222.
- Lleo, M.M., Bonato, B., Tafi, M.C., Signoretto, C., Boaretti, M. and Canepari, P. (2001) Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *Journal of applied microbiology* 91(6), 1095-1102.
- Lowder, M., Unge, A., Maraha, N., Jansson, J.K., Swiggett, J. and Oliver, J.D. (2000) Effect of starvation and the viable-but-nonculturable state on green fluorescent protein (GFP) fluorescence in GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* A506. *Applied and environmental microbiology* 66(8), 3160-3165.
- Luck, P.C., Jacobs, E., Roske, I., Schroter-Bobsin, U., Dumke, R. and Gronow, S. (2010) *Legionella dresdenensis* sp. nov., isolated from river water. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60(Pt 11), 2557-2562.

Mallegol, J., Duncan, C., Prashar, A., So, J., Low, D.E., Terebezni, M. and Guyard, C. (2012) Essential roles and regulation of the *Legionella pneumophila* collagen-like adhesin during biofilm formation. PLoS one 7(9), e46462.

Mampel, J., Spirig, T., Weber, S.S., Haagensen, J.A., Molin, S. and Hilbi, H. (2006) Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. Applied and environmental microbiology 72(4), 2885-2895.

Marra, A., Horwitz, M.A. and Shuman, H.A. (1990) The HL-60 model for the interaction of human macrophages with the Legionnaires' disease bacterium. Journal of immunology 144(7), 2738-2744.

Maruta, K., Miyamoto, H., Hamada, T., Ogawa, M., Taniguchi, H. and Yoshida, S. (1998) Entry and intracellular growth of *Legionella dumoffii* in alveolar epithelial cells. American journal of respiratory and critical care medicine 157(6 Pt 1), 1967-1974.

McCoy, W.F., Bryers, J.D., Robbins, J. and Costerton, J.W. (1981) Observations of fouling biofilm formation. Canadian journal of microbiology 27(9), 910-917.

McDade, J.E., Brenner, D.J. and Bozeman, F.M. (1979) Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. Annals of internal medicine 90(4), 659-661.

McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A. and Dowdle, W.R. (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. The New England journal of medicine 297(22), 1197-1203.

McNally, C., Hackman, B., Fields, B.S. and Plouffe, J.F. (2000) Potential importance of Legionella species as etiologies in community acquired pneumonia (CAP). Diagnostic microbiology and infectious disease 38(2), 79-82.

Messi, P., Bargellini, A., Anacarso, I., Marchesi, I., de Niederhausern, S. and Bondi, M. (2013) Protozoa and human macrophages infection by *Legionella pneumophila* environmental strains belonging to different serogroups. Archives of microbiology 195(2), 89-96.

Mody, C.H., Paine, R., Shahrabadi, M.S., Simon, R.H., Pearlman, E., Eisenstein, B.I. and Toews, G.B. (1993) *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. Journal of Infectious Diseases 167(5), 1138-1145.

Mogoa, E., Bodet, C., Morel, F., Rodier, M.H., Legube, B. and Hechard, Y. (2011) Cellular response of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* to chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine treatments. Applied and environmental microbiology 77(14), 4974-4980.

Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M. and Abu Kwaik, Y. (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. Applied and environmental microbiology 71(1), 20-28.

Molofsky, A.B. and Swanson, M.S. (2004) Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. Molecular microbiology 53(1), 29-40.

Mukamolova, G.V., Kaprelyants, A.S., Young, D.I., Young, M. and Kell, D.B. (1998) A bacterial cytokine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(15), 8916-8921.

Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S. and Donlan, R.M. (2001) Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. Microbiology 147(Pt 11), 3121-3126.

- Neumeister, B. (2004) Intracellular multiplication of *Legionella* species and the influence of amoebae on their intracellular growth in human monocytes: mono mac 6 cells and *Acanthamoeba castellanii* as suitable in vitro models. *Methods in molecular biology* 268, 141-151.
- Nguyen, T.M., Ilef, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D., Haeghebaert, S., Ganiayre, F., Marcel, F., Etienne, J. and Desenclos, J.C. (2006) A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread? *The Journal of infectious diseases* 193(1), 102-111.
- Nowakowska, J. and Oliver, J.D. (2013) Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS microbiology ecology* 84(1), 213-222.
- Nystrom, T. (2003) Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cells at death's door? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 25(3), 204-211.
- Ohno, A., Kato, N., Yamada, K. and Yamaguchi, K. (2003) Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Applied and environmental microbiology* 69(5), 2540-2547.
- Oliver, J.D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of microbiology* 43 Spec No, 93-100.
- Oliver, J.D. (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews* 34(4), 415-425.
- Orsi, G.B., Vitali, M., Marinelli, L., Ciorba, V., Tufi, D., Del Cimmuto, A., Ursillo, P., Fabiani, M., De Santis, S., Protano, C., Marzuillo, C. and De Giusti, M. (2014) Legionella control in the water system of antiquated hospital buildings by shock and continuous hyperchlorination: 5 years experience. *BMC infectious diseases* 14, 394.
- Pagnier, I., Croce, O., Robert, C., Raoult, D. and La Scola, B. (2014) Genome Sequence of *Legionella anisa*, Isolated from a Respiratory Sample, Using an Amoebal Coculture Procedure. *Genome announcements* 2(1).
- Pagnier, I., Raoult, D. and La Scola, B. (2008) Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. *Environmental microbiology* 10(5), 1135-1144.
- Park, M., Yun, S.T., Kim, M.S., Chun, J. and Ahn, T.I. (2004) Phylogenetic characterization of Legionella-like endosymbiotic X-bacteria in *Amoeba proteus*: a proposal for '*Candidatus Legionella jeonii*' sp. nov. *Environmental microbiology* 6(12), 1252-1263.
- Pawlowski, D.R., Metzger, D.J., Raslawsky, A., Howlett, A., Siebert, G., Karalus, R.J., Garrett, S. and Whitehouse, C.A. (2011) Entry of *Yersinia pestis* into the viable but nonculturable state in a low-temperature tap water microcosm. *PloS one* 6(3), e17585.
- Pearlman, E., Jiwa, A.H., Engleberg, N.C. and Eisenstein, B.I. (1988) Growth of *Legionella pneumophila* in a human macrophage-like (U937) cell line. *Microbial pathogenesis* 5(2), 87-95.
- Pecastaings, S., Berge, M., Dubourg, K.M. and Roques, C. (2010) Sessile *Legionella pneumophila* is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms. *Biofouling* 26(7), 809-819.

Pinto, D., Almeida, V., Almeida Santos, M. and Chambel, L. (2011) Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. *Journal of applied microbiology* 110(6), 1601-1611.

Pinto, D., Santos, M.A. and Chambel, L. (2013) Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Critical reviews in microbiology*.

Pravinkumar, S.J., Edwards, G., Lindsay, D., Redmond, S., Stirling, J., House, R., Kerr, J., Anderson, E., Breen, D., Blatchford, O., McDonald, E. and Brown, A. (2010) A cluster of Legionnaires' disease caused by *Legionella longbeachae* linked to potting compost in Scotland, 2008-2009. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 15(8), 19496.

Puspita, I.D., Kamagata, Y., Tanaka, M., Asano, K. and Nakatsu, C.H. (2012) Are uncultivated bacteria really uncultivable? *Microbes and environments / JSME* 27(4), 356-366.

Rahman, I., Shahamat, M., Chowdhury, M.A. and Colwell, R.R. (1996) Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. *Applied and environmental microbiology* 62(1), 115-120.

Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G.P. and Shinoda, S. (2014) Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Frontiers in public health* 2, 103.

Ramseier, M.K., von Gunten, U., Freihofer, P. and Hammes, F. (2011) Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate(VI), and permanganate. *Water research* 45(3), 1490-1500.

Ratzow, S., Gaia, V., Helbig, J.H., Fry, N.K. and Luck, P.C. (2007) Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *Journal of clinical microbiology* 45(6), 1965-1968.

Reissbrodt, R., Rienaecker, I., Romanova, J.M., Freestone, P.P., Haigh, R.D., Lyte, M., Tschape, H. and Williams, P.H. (2002) Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. *Applied and environmental microbiology* 68(10), 4788-4794.

Riffard, S., Douglass, S., Brooks, T., Springthorpe, S., Fillion, L.G. and Sattar, S.A. (2001) Occurrence of Legionella in groundwater: an ecological study. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 43(12), 99-102.

Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V. and Keevil, C.W. (1994) Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems. *Applied and environmental microbiology* 60(6), 1842-1851.

Rozsak, D.B., Grimes, D.J. and Colwell, R.R. (1984) Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Canadian journal of microbiology* 30(3), 334-338.

Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of clinical pathology* 33(12), 1179-1183.

Salloum, G., Meugnier, H., Reyrolle, M., Grimont, F., Grimont, P.A., Etienne, J. and Freney, J. (2002) Identification of Legionella species by ribotyping and other molecular methods. *Research in microbiology* 153(10), 679-686.

- Salvatorelli, G., Medici, S., Finzi, G., De Lorenzi, S. and Quarti, C. (2005) Effectiveness of installing an antibacterial filter at water taps to prevent Legionella infections. *The Journal of hospital infection* 61(3), 270-271.
- Scheid, P. (2014) Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. *Parasitology research* 113(7), 2407-2414.
- Seitz, M., Zwicker, M. and Loetscher, P. (1998) Effects of methotrexate on differentiation of monocytes and production of cytokine inhibitors by monocytes. *Arthritis and rheumatism* 41(11), 2032-2038.
- Senoh, M., Ghosh-Banerjee, J., Ramamurthy, T., Colwell, R.R., Miyoshi, S., Nair, G.B. and Takeda, Y. (2012) Conversion of viable but nonculturable enteric bacteria to culturable by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiology and immunology* 56(5), 342-345.
- Senoh, M., Ghosh-Banerjee, J., Ramamurthy, T., Hamabata, T., Kurakawa, T., Takeda, M., Colwell, R.R., Nair, G.B. and Takeda, Y. (2010) Conversion of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to the culturable state by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiology and immunology* 54(9), 502-507.
- Shimada, T., Noguchi, Y., Jackson, J.L., Miyashita, J., Hayashino, Y., Kamiya, T., Yamazaki, S., Matsumura, T. and Fukuhara, S. (2009) Systematic review and metaanalysis: urinary antigen tests for Legionellosis. *Chest* 136(6), 1576-1585.
- Spirig, T., Taden, A., Kiefer, P., Buchrieser, C., Vorholt, J.A. and Hilbi, H. (2008) The Legionella autoinducer synthase LqsA produces an alpha-hydroxyketone signaling molecule. *The Journal of biological chemistry* 283(26), 18113-18123.
- Squinazi, F. (2006) Biofilm et matériaux des réseaux intérieurs de distribution d'eau. De la maîtrise des réseaux à la qualité de l'eau. Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris.
- Srinivasan, A., Bova, G., Ross, T., Mackie, K., Paquette, N., Merz, W. and Perl, T.M. (2003) A 17-month evaluation of a chlorine dioxide water treatment system to control Legionella species in a hospital water supply. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 24(8), 575-579.
- Steele, T.W., Lanser, J. and Sangster, N. (1990) Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes. *Applied and environmental microbiology* 56(1), 49-53.
- Steinert, M., Emody, L., Amann, R. and Hacker, J. (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and environmental microbiology* 63(5), 2047-2053.
- Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C. and Glockner, G. (2007) Legionella pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International journal of medical microbiology : IJMM* 297(7-8), 577-587.
- Steinert, M., Ockert, G., Luck, C. and Hacker, J. (1998) Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system. *Zentralblatt für Bakteriologie : international journal of medical microbiology* 288(3), 331-342.
- Stewart, C.R., Muthye, V. and Cianciotto, N.P. (2012) *Legionella pneumophila* persists within biofilms formed by *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium sp.*, and *Pseudomonas fluorescens* under dynamic flow conditions. *PloS one* 7(11), e50560.

- Stewart, E.J. (2012) Growing unculturable bacteria. *Journal of bacteriology* 194(16), 4151-4160.
- Stone, B.J., Brier, A. and Kwaik, Y.A. (1999) The *Legionella pneumophila* prp locus; required during infection of macrophages and amoebae. *Microbial pathogenesis* 27(6), 369-376.
- Stone, B.J. and Kwaik, Y.A. (1999) Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili. *Journal of bacteriology* 181(5), 1395-1402.
- Storey, M.V., Winiecka-Krusnell, J., Ashbolt, N.J. and Stenstrom, T.A. (2004) The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant Acanthamoebae and Legionellae. *Scandinavian journal of infectious diseases* 36(9), 656-662.
- Sukthana, Y., Lekkla, A., Sutthikornchai, C., Wanapongse, P., Vejjajiva, A. and Bovornkitti, S. (2005) Spa, springs and safety. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 36 Suppl 4, 10-16.
- Sun, F., Chen, J., Zhong, L., Zhang, X.H., Wang, R., Guo, Q. and Dong, Y. (2008) Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS microbiology ecology* 64(1), 37-44.
- Szabo, J. and Minamyer, S. (2014) Decontamination of biological agents from drinking water infrastructure: a literature review and summary. *Environment international* 72, 124-128.
- Thomas, C., Hill, D. and Mabey, M. (2002) Culturability, injury and morphological dynamics of thermophilic *Campylobacter* spp. within a laboratory-based aquatic model system. *Journal of applied microbiology* 92(3), 433-442.
- Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J.F. and Levi, Y. (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of applied microbiology* 97(5), 950-963.
- Tiaden, A. and Hilbi, H. (2012) alpha-Hydroxyketone synthesis and sensing by *Legionella* and *Vibrio*. *Sensors* 12(3), 2899-2919.
- Tilney, L.G., Harb, O.S., Connelly, P.S., Robinson, C.G. and Roy, C.R. (2001) How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *Journal of cell science* 114(Pt 24), 4637-4650.
- Tosetti, N., Croxatto, A. and Greub, G. (2014) Amoebae as a tool to isolate new bacterial species, to discover new virulence factors and to study the host-pathogen interactions. *Microbial pathogenesis* 77, 125-130.
- van Heijnsbergen, E., de Roda Husman, A.M., Lodder, W.J., Bouwknecht, M., van Leeuwen, A.E., Bruin, J.P., Euser, S.M., den Boer, J.W. and Schalk, J.A. (2014) Viable *Legionella pneumophila* bacteria in natural soil and rainwater puddles. *Journal of applied microbiology*.
- Wadowsky, R.M. and Yee, R.B. (1981) Glycine-containing selective medium for isolation of Legionellaceae from environmental specimens. *Applied and environmental microbiology* 42(5), 768-772.

- Wai, S.N., Mizunoe, Y., Takade, A. and Yoshida, S. (2000) A comparison of solid and liquid media for resuscitation of starvation- and low-temperature-induced nonculturable cells of *Aeromonas hydrophila*. Archives of microbiology 173(4), 307-310.
- Wallis, L. and Robinson, P. (2005) Soil as a source of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (Lp1). Australian and New Zealand journal of public health 29(6), 518-520.
- Walser, S.M., Gerstner, D.G., Brenner, B., Holler, C., Liebl, B. and Herr, C.E. (2014) Assessing the environmental health relevance of cooling towers--a systematic review of legionellosis outbreaks. International journal of hygiene and environmental health 217(2-3), 145-154.
- Watnick, P. and Kolter, R. (2000) Biofilm, city of microbes. Journal of bacteriology 182(10), 2675-2679.
- Whitesides, M.D. and Oliver, J.D. (1997) Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. Applied and environmental microbiology 63(3), 1002-1005.
- WHO (1999) World Health Organization recommended surveillance standards.
- WHO (2004) Gaining Health, the European Strategy for Prevention and Control of Non-communicable Diseases.
- Wolcott, R., Costerton, J.W., Raoult, D. and Cutler, S.J. (2013) The polymicrobial nature of biofilm infection. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 19(2), 107-112.
- Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J. and Colwell, R.R. (1982) Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microbial ecology 8(4), 313-323.
- Yamamoto, H., Hashimoto, Y. and Ezaki, T. (1996) Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. FEMS microbiology ecology 20(3), 149-154.
- Yanez, M.A., Nocker, A., Soria-Soria, E., Murtula, R., Martinez, L. and Catalan, V. (2011) Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. Journal of microbiological methods 85(2), 124-130.
- Yu, V.L., Plouffe, J.F., Pastoris, M.C., Stout, J.E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C.M., Paterson, D.L. and Cheresky, A. (2002) Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. The Journal of infectious diseases 186(1), 127-128.
- Zhang, Z., McCann, C., Stout, J.E., Piesczynski, S., Hawks, R., Vidic, R. and Yu, V.L. (2007) Safety and efficacy of chlorine dioxide for Legionella control in a hospital water system. Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America 28(8), 1009-1012.
- Zhao, F., Bi, X., Hao, Y. and Liao, X. (2013) Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by high pressure CO₂ and its characteristics. PloS one 8(4), e62388.
- Zhou, S., Shao, Y., Gao, N., Li, L., Deng, J., Zhu, M. and Zhu, S. (2014) Effect of chlorine dioxide on cyanobacterial cell integrity, toxin degradation and disinfection by-product formation. The Science of the total environment 482-483, 208-213.

VIII. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications:

- 1) Viable but Not Culturable Forms of *Legionella pneumophila* Generated After Heat Shock Treatment Are Infectious for Macrophage-Like and Alveolar Epithelial Cells After Resuscitation on *Acanthamoeba polyphaga*.
T. Epalle, F. Girardot , S. Allegra , C. Maurice-Blanc , O. Garraud , S. Riffard
Microb Ecol DOI 10.1007/s00248-014-0470-x

- 2) Monitoring *Legionella* viability after chlorine dioxide treatment using Flow Cytometry
P. Mustapha, **T. Epalle**, S. Allegra, F. Girardot, O. Garraud, S. Riffard
Research in Microbiology (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2015.01.004>

- 3) AFM, CLSM and EIS characterization of the immobilization of antibodies on indium–tin oxide electrode and their capture of *Legionella pneumophila*.
M. Souiri, N. Blel, D. Sboui, L. Mhamdi, **T. Epalle**, R. Mzoughi, A. Othmane, et S. Riffard
Talanta; 2014 Jan; 118:224-30.

- 4) Contactless functional testing of grating-coupled evanescent wave (bio)chemical Sensors
D. Pietroy, O. Parriaux, **T. Epalle**, S. Tonchev
Sensors and Actuators : Chemical B Nov 2011, 27–32

Communications orales :

- 1) 3^{ème} colloque national SYMPOLEGIO : *Legionella* : de l’environnement à l’homme 26-27 novembre 2013 Lyon, France : Evaluation of the infectivity of viable but non-culturable forms of *Legionella pneumophila* generated after heat shock treatment using macrophage-like U937, HL-60 cells and *Acanthamoeba polyphaga*
T. Epalle, S. Allegra, F. Girardot, C. Maurice-Blanc, B. Pozzetto, S. Riffard

- 2) 9^{ème} journées Maghreb-Europe : “Matériaux et Applications aux DIispositifs et CAPteurs” (MADICA) : 4-7 novembre 2014, Mahdia, Tunisie Development of an electrochemical immunosensor for the detection of *Legionella pneumophila* VBNC forms in environmental samples.
D. Sboui, M. Souiri, M. Ben Ismail, **T. Epalle**, R. Mzoughi, F. Girardot, S. Allegra, N. Jaffrezic, S. Riffard, A. Othmane

- 3) 5^{ème} International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, BioMicroWorld2013, Madrid, Espagne, 2-4 octobre 2013 : Evaluation of the infectivity of viable but non-culturable forms of *Legionella pneumophila* generated after heat shock treatment using macrophage-like U937, HL-60 cells and *Acanthamoeba polyphaga*.
T. Epalle, S. Allegra, F. Girardot, C. Maurice-Blanc, B. Pozzetto, S. Riffard

- 4) Congrès GO2S (Guided Optics and sensor systems) le 04 et 05 février 2013 à St Etienne, France : Capteur à onde évanescente à excitation par réseau et immobilisation d'une monocouche d'anticorps sur guide en HfO₂ pour la capture et le suivi de la concentration de *Legionella pneumophila* dans des échantillons environnementaux
T. Epalle, S. Allegra, F. Girardot, B. Pozzetto, S. Riffard, F. Gruy, C. Lambert, L. Navarro, O. Parriaux, Y. Jourlin, S. Reynaud, S. Tonchev, S. Palle, F. Pigeon

- 5) SympoLegio *Legionella* : de l'environnement à l'homme, Lyon, France, 15 -16 Novembre 2011 : Viabilité des légionelles dans l'environnement : quelques outils d'analyse
S. Allegra, F. Girardot, F. Grattard, **T. Epalle**, P. Berthelot, B. Pozzetto, S. Riffard

- 6) Rencontres scientifiques ANSES « De l'émergence à la résurgence des agents biologiques : caractérisation des facteurs de risque pour l'homme », Paris, France, 30 novembre 2011: Développement et évaluation d'un micro-biocapteur pour l'immunodétection en temps réel de *Legionella pneumophila* dans les prélèvements environnementaux (LEGIOCAPT Phase1).
S. Riffard au nom du groupe biocapteur (ENSMSE, UJM).

Posters :

- 1) Journée scientifique de l'IFRESIS 17 octobre 2013 Saint Etienne : Evaluation de la pathogénicité des formes viables non cultivable de *Legionella pneumophila*, contre les macrophages-like et les amibes
T. Epalle, S. Allegra, F. Girardot, B. Pozzetto, S. Riffard

- 2) 3^{ème} colloque national SYMPOLEGIO : *Legionella* : de l'environnement à l'homme 26-27 novembre 2013 Lyon, France: AFM, CLSM and EIS characterization of the immobilization of antibodies on indium-tin oxide electrode and their capture of *Legionella pneumophila*.
M. Souiri, D. Sboui, N. Blel, L. Mhamdi, **T. Epalle**, R. Mzoughi, A. Othmane, S. Riffard

Viable but Not Culturable Forms of *Legionella pneumophila* Generated After Heat Shock Treatment Are Infectious for Macrophage-Like and Alveolar Epithelial Cells After Resuscitation on *Acanthamoeba polyphaga*

Thibaut Epalle & Françoise Girardot & Séverine Allegra & Cécile Maurice-Blanc & Olivier Garraud & Serge Riffard

Received: 18 June 2014 / Accepted: 18 July 2014
Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract *Legionella pneumophila*, the causative agent of legionellosis is transmitted to human through aerosols from environmental sources and invades lung's macrophages. It also can invade and replicate within various protozoan species in environmental reservoirs. Following exposures to various stresses, *L. pneumophila* enters a non-replicative viable but non-culturable (VBNC) state. Here, we evaluated whether VBNC forms of three *L. pneumophila* serogroup 1 strains (Philadelphia GFP 008, clinical 044 and environmental RNN) infect differentiated macrophage-like cell lines (U937 and HL-60), A549 alveolar cells and *Acanthamoeba polyphaga*. VBNC forms obtained following shocks at temperatures ranging from 50 to 70 °C for 5 to 60 min were quantified using a flow cytometric assay (FCA). Their loss of culturability was checked on BCYE agar medium. VBNC forms were systematically detected upon a 70 °C heat shock for 30 min. When testing their potential to resuscitate upon amoebal infection, VBNC forms obtained after 30 min at 70 °C were re-cultivated except for the clinical strain. No resuscitation or cell lysis was evidenced when using U937, HL-60, or A549 cells despite the use of various contact times and culture media. None of the strains tested could infect *A. polyphaga*, macrophage-like or alveolar epithelial cells after a 60-min treatment at 70 °C. However, heat-treated VBNC forms were able to infect macrophage-like or alveolar epithelial cells following their resuscitation on *A. polyphaga*.

These results suggest that heat-generated VBNC forms of *L. pneumophila* (i) are not infectious for macrophage-like or alveolar epithelial cells in vitro although resuscitation is still possible using amoeba, and (ii) may become infectious for human cell lines following a previous interaction with *A. polyphaga*.

Introduction

Legionella are ubiquitous in natural and man-made aquatic environments. *Legionella pneumophila*, the most frequently associated species, is the causative agent of a severe pneumonia called Legionnaires' disease [1]. In humans, *L. pneumophila* is able to replicate in alveolar macrophages in the lung [2] whereas, in the environment, various species of protozoa may support its growth [3– 5]. Human infection occurs through the inhalation of contaminated aerosols, produced by showers, air conditioning systems such as cooling towers and other aerosol-generating devices [6]. In most countries, such as France, monitoring of *Legionella* in hot water systems is recommended to prevent outbreaks [7, 8].

Different curative procedures are available to control the growth of *Legionella* in water systems. Heat shocks (30 min at 70 °C) and various chemical treatments: continuous chlorination using chlorine dioxide or monochloramines, for instance are commonly used [9]. However, their effectiveness for hospital hot water systems disinfection is discussed because of the following: (i) temperatures higher than 60 °C, at each outlet, cannot be reliably maintained in large buildings [10] and (ii) recolonisation is often observed few weeks or months later.

Thus, the optimal strategy for long-term control of *L. pneumophila* in water systems is not yet defined. Under appropriate conditions, *L. pneumophila* can also survive for

T. Epalle · F. Girardot · S. Allegra · C. Maurice-Blanc · O. Garraud
Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP),
EA 3064, SFR 143, University of Lyon, 42023 Saint-Etienne, France

S. Riffard (*)
Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes
(GIMAP), EA 3064, SFR 143, Faculté de Médecine J. Lisfranc,
Université Jean Monnet, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-
Etienne, France e-mail: serge.riffard@univ-st-etienne.fr

Published online: 30 July 2014

long periods as a free organism in low-nutrient environments [5, 11]. It is also widely accepted that biofilms play a critical role in the persistence of these bacteria within water systems [12]. The strategies of *L. pneumophila* to adapt and resist to stressful environmental conditions not only include interaction with amoebae and biofilm localisation but also the ability to enter into a viable but non-culturable (VBNC) state. Such a VBNC state, for *Legionella*, is associated with a loss of culturability on BCYE (i.e. not visible to the naked eye), an inhibition of cell division [13], a very low protein synthesis rates [14] and resuscitation after culture on amoebae or chick embryos [15– 17].

Different stressful conditions such as poor nutrient conditions, heat and concentrated salts of hot spring waters or chlorine treatment can lead to a VBNC state in *L. pneumophila* populations [18, 16]. It has been suggested that such VBNC forms may regain pathogenic potential following a resuscitation stage in amoebae [15, 19]. Providing that culturable forms of *Legionella* infect both amoebae and macrophages, our objective was to evaluate whether VBNC forms may also be infectious for macrophages or alveolar epithelial cells.

So, the aim of this work was to study the VBNC pathogenicity not only against their “natural” hosts within the environment (amoebae) but also in human cells (differentiated macrophage-like cells or alveolar epithelial cells). For this purpose, we used three different strains of *L. pneumophila* (reference, clinical and environmental). The presence of VBNC forms was evaluated after heat shock treatments (30 min at 70 °C as recommended by WHO [8] as well as lower temperatures as an attempt to match real conditions of water systems treatments) using flow cytometry as described in our previous work [15]. U937 and HL-60 cell lines were used as representative of the respiratory mucosa [20] and *Acanthamoeba polyphaga* was chosen as model amoeba. Intracellular growth and cytotoxicity of *L. pneumophila* in A549 alveolar epithelial cells have been demonstrated [21] as well as cytokines production [22]. We first analysed the physiological response of these three strains following different heat shock treatments. Then we investigated whether these VBNC forms may be infectious for both human cell lines and amoebae in order to address the pertinence of WHO recommendation for water systems disinfection [8].

Materials and Methods

Cells Culture

A. polyphaga was maintained at 30 °C in axenic conditions as monolayers in 25-cm² tissue culture flasks (BD Biosciences, France) containing 10 mL peptone-yeast-glucose broth (PYG, 2 % proteose peptone no. 3, 0.1 % yeast extract, 0.1 M glucose, 4 mM MgSO₄, 0.4 M CaCl₂, 0.1 % sodium citrate,

0.05 M Fe(NH₄)₂–6H₂O, 2.5 mM NaH₂PO₃, 2.5 mM K₂HPO₃ (pH 6.5)). For our studies, 5-day-old PYG cultures of the protozoa, grown to confluence, were placed for 15 min on ice. Amoebae were brought in suspension by rapping the flask and cells were centrifuged and re-suspended in the same media. Cell counts were determined with a KOVA@Glasstic@Slide 10 (HYCOR) chamber under an inverted microscope.

The human macrophage-like cell lines U937 and HL-60 were cultured at 37 °C in RPMI-1640 Ready mix with L-Glutamine (PAA Laboratories/GE Healthcare Europe GmbH Velizy-Villacoublay, France) with 10 % foetal bovine serum (SVF, Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) or IMDM (PAA Laboratories) with 20 % SVF respectively in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ in 75 cm² tissue culture flasks. Cells were differentiated as previously described [23, 24]. Cells differentiation was confirmed by the detection of the specific markers CD11b, CD11c and CD68 using a BD FACSCalibur flow cytometer [25].

The human alveolar epithelial cell lines A549 was cultured at 37 °C in DMEM Nutrient Mixture F12 HAM (PAA Laboratories/GE Healthcare Europe GmbH Velizy-Villacoublay, France) with 10 % foetal bovine serum (SVF, Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ in 175 cm² tissue culture flasks.

A GFP-modified *L. pneumophila* Philadelphia strain named 008 (Lp1-008) was provided by Centre National de Référence des Légionelles-Lyon, France. *L. pneumophila* 044 (clinical strain Lp1-044) and *L. pneumophila* RNN (environmental strain Lp1-RNN) were obtained from Centre Hospitalier Universitaire, Saint Etienne, France. They were stored at –80 °C in Cryobank tubes (Mast Diagnostic, Amiens, France). After thawing, the cells were plated onto BCYE agar (Buffered Charcoal Yeast Extract, Oxoid, France) for 72 h at 37 °C. They were then re-plated onto the same medium and incubated for another 72 h at 37 °C. This *L. pneumophila* culture, which was in the beginning of stationary phase, was then used to inoculate 40 mL sterile normal saline (0.9 % NaCl) water to achieve an optical density of 0.2 at 600 nm (Biomate TM3; Avanteq, Illkirch, France), which corresponds to a final concentration of 10⁸ CFU/mL. The bacteria were then immediately used for heat shock treatments.

In Vitro Heat Shock Treatments

Heat shock treatments were performed in a water bath set at 50, 56, 60, 65 or 70 °C for 5, 10, 30 and 60 min with 2 mL of *Legionella* suspension at 10⁸ CFU/mL, poured in a 4-mL flow cytometry tube (BD Biosciences, France). The time to reach the expected temperature within the tubes was taken into consideration.

After heat shock, 100 μ L was harvested from the flow cytometry tube and spread on BCYE in duplicates in order to measure culturability.

As control, untreated *Legionella* suspensions at 10^8 cells/ mL were serially diluted in normal saline (0.9 % NaCl) to 10^3 cells/mL and 100 μ L was plated on BCYE in duplicates. All plates were incubated at 37 °C for 10 days.

Flow Cytometric Assay

Flow cytometric assay (FCA) was used to numerate dead and viable forms in 10^8 CFU/mL *Legionella* suspensions before and after heat shock. For this purpose, 10 μ L of each suspension of Lp1-044 and Lp1-RNN was diluted to 1/100 in normal saline (0.9 % NaCl) and stained using Syto9 and propidium iodide (PI). For Lp1-008 which expresses GFP, only propidium iodide was used. Flow cytometric measurements were performed by using a BD FACSCalibur instrument (Becton Dickinson Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) as previously described [26]. The bacteria were visualized on a dot plot of PI red fluorescence (FL3) versus GFP green fluorescence (FL1) for Lp1-008 or SYTO 9 for Lp1-044 and Lp1-RNN. In this study, the VBNC status of the cells was confirmed by loss of culturability on BCYE medium.

Cells Infection Procedures by Treated and Untreated *Legionella*

Infection of *A. polyphaga* was performed in six-well tissue culture plates containing 5.10^5 cells per well at 30 or 37 °C for 4 days in Pages' amoebal saline (PAS) buffer. Infection of U937 and HL-60 macrophages or A549 alveolar epithelial cells was performed in 24-well culture plates containing 10^6 cells per well, at 37 °C under 5 % CO₂, in Hank's Balance Salt Solution (HBSS, PAA) for 4 or 6 days.

Infection procedures were made either with *Legionella* suspensions subjected or not to heat shock (30 and 60 min at 70 °C) or with a lysate of amoebae infected for 4 days at 30 °C at a multiplicity of infection (MOI) of 10 with heat-treated and untreated *Legionella*.

Based on FCA results, suspensions of *Legionella* were added to amoeba, macrophage and alveolar epithelial cells at different MOIs: 1 or 10 viable *Legionella* for 1 macrophage or alveolar epithelial cell (MOIs 1 and 10, respectively) and 10 or 100 viable *Legionella* for 1 amoeba (MOIs 10 and 100, respectively). When no viable cells were detected following a heat shock, 1 mL of treated suspension was added to amoeba, macrophage cells or alveolar epithelial cells. At the end of the incubation, all amoebae were lysed by repeated pipetting and centrifuged at 7,500 \times g for 8 min to collect *Legionella* cells. Cells lysis was verified by microscope examination. The pellets were re-suspended in 210 μ L of sterile water. For infection with amoebal lysates, 100 μ L was added

to macrophage-like U937 or HL-60 or alveolar epithelial cells and 100 μ L was plated on BCYE and incubated for 10 days at 37 °C for culture resuscitation analysis. Ten microlitres was added to 1 mL of sterile normal saline (0.9 % NaCl) water and analysed by FCA as described above. Following cell lines infection, BCYE culture and FCA analysis were made using the same procedure.

Monitoring of *Legionella* Entry into Cells

The entry of *Legionella* into cells was monitored for 144 h by fluorescent microscopy (NIKON Eclipse Ti). For this purpose, each suspension of Lp1-044 and Lp1-RNN was stained using Syto9 after heat shock treatment as described above for FCA.

Videomicroscopy (Zeiss Axio Observer Z1) was used to monitor the co-cultures between Lp1-008 reference strain and *A. polyphaga*. Pictures were taken each 2 h for 12 h.

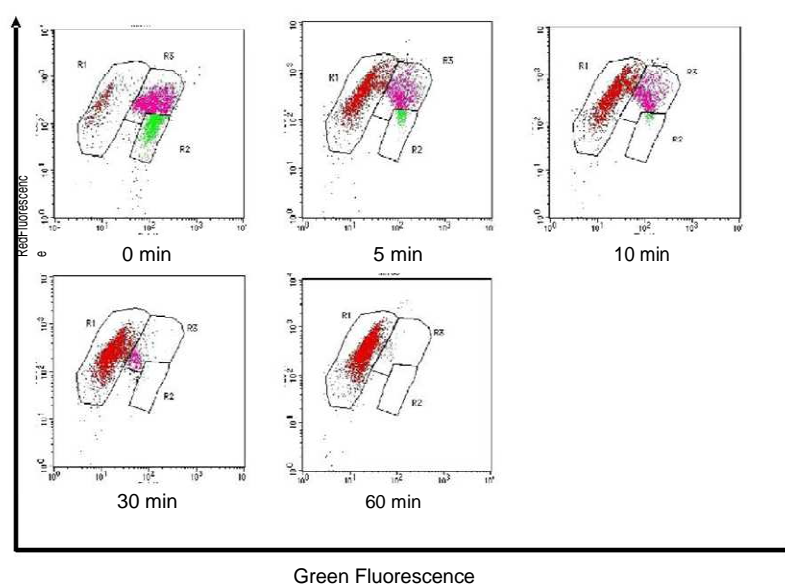
Results

Physiological States of *L. pneumophila* Cells After Heat Shock Treatments

For this study, we used one clinical strain (Lp1-044), one strain isolated from a contaminated water circuit (Lp1-RNN) and one GFP-modified reference strain (Lp1-008) of *L. pneumophila* serogroup 1. These strains were submitted to heat shocks ranging from 50 to 70 °C for 5 to 60 min. The culturability of bacteria in *L. pneumophila* suspensions subjected to heat shock treatments was assessed by culture on BCYE medium and FCA was used to evaluate the percentage of dead (DC), viable and culturable (VC) and non-culturable (VBNC) cells. As an example, Fig. 1 shows the cytograms of Lp1-RNN heat treatment kinetic (as the result of one experiment at 70 °C). At t=0, a few dead cells (R1=10 %) and VBNC (R3=20 %) were observed. Five or 10 min of heat shock resulted in a dramatical increase (75 %) of the number of dead cells although no variation of the number of VBNC cells was observed. For the longest exposure, a total loss of culturability was recorded.

Cytograms obtained with the three strains before and after heat shocks were strongly reproducible (four independent experiments). Mean percentages of each population for all strains for 5, 10, 30 and 60 min heat shocks were calculated from the cytograms. All results are shown in Fig. 2. As noticed for Lp1-RNN, DC, VC and VBNC cells were systematically observed in control (untreated) cells although percentages of each population may slightly vary from an experiment to another. Each strain exhibited its own distribution of untreated cells (see Fig. 2). In brief, populations of the reference strain were distributed as follows: 60 % of VC forms (standard

Fig. 1 Kinetic analysis by FCA of physiological forms of Lp1-RNN after heat shock treatments at 70 °C from 0 to 60 min. The bacteria were visualised on a dot plot of PI red fluorescence (FL3) versus SYTO 9 green fluorescence (FL1). The R1 region corresponds to dead cells. Culture results on BCYE and Syto 9-stained bacteria with intact membranes were used to delineate the R2 region (viable, culturable cells). The R3 region (VBNC cells) corresponds to bacteria in an intermediate state with compromised membranes



deviation ± 7), 20 ± 6 % of VBNC forms and 20 ± 3 % of DC forms. The distribution of the clinical strain was as follows: 50 ± 6 % of VC forms, 25 ± 3 % of VBNC forms and 25 ± 4 % of DC forms whereas, for the environmental strain, populations vary from 55 ± 11 % for VC forms, 15 ± 6 % for VBNC forms and 30 ± 5 % for DC forms. The percentage of DC in the untreated suspensions of the environmental strain (Lp1-RNN) was always higher to that of the other strains. This strain was found more sensitive to heat shock than Lp1-008 and Lp1-044.

Whatever the strain, VC populations were still detected after a 60-min heat shock at 50 °C and following a 10-min heat shock at 60 °C as confirmed by growth controls. However, VC can no longer be detected after 30 min at 60 °C (all strains) or 56 °C for both reference (Lp-008) and environmental (Lp-RNN) strains. In addition, there were several "VBNC patterns" depending on the strains considered. VBNC were still unambiguously detected after a 60-min treatment at 70 °C for both reference and clinical strains. The environmental strain was killed after a 60-min heat shock for temperatures higher than 50 °C. VBNC were still detected after a 30-min treatment for all temperatures. The reference strain was no longer culturable following a 30-min treatment at 56 or 60 °C, whereas for the clinical strain, a treatment of 30 min at 60 °C was necessary to observe a significant decrease in the number of colonies observed on BCYE media. When focusing on VBNC cells, for the reference strain, a global population of VBNC forms was always present (in identical proportions—in the order of 20–30 % of the total of the cells) regardless of the stress applied (temperature and duration of exposure). The environmental strain had roughly the same "behaviour" except for a stress duration of 60 min (whatever the temperature applied) where VBNC forms could no longer be detected. When considering the clinical strain, VBNC forms were

systematically observed irrespective of the stress applied, but their proportion increased with the duration and the temperature (10 to 50 % of the total cells).

Infectivity of Macrophage-Like and Alveolar Epithelial Cells by *L. pneumophila* VBNC

The three strains of *Legionella* that were shocked for 30 min at 70 °C, which corresponds to the WHO recommended treatment to control the proliferation of *Legionella* in water systems, were used to infect differentiated macrophages or alveolar epithelial cells. After 4 or 6 days of contact, cells were harvested, lysed and plated onto BCYE medium to measure culturability.

For Lp1-008, untreated bacteria were able to penetrate and to multiply within U937 cells (data not shown).

When testing VBNC presence after a heat shock of 30 min at 70 °C, if a few VBNC were observed within the cells, neither cells lysis nor resuscitation (as no colony has grown on BCYE media after 10 days of culture) were shown. The same results were observed with Lp1-044 and Lp1-RNN for both differentiated HL-60 and A549 cells (data not shown).

The same results were observed after a heat shock treatment at 60 °C for 30 min (data not shown).

VBNC Resuscitation Capability on *A. polyphaga* Amoeba

After a 70 °C heat shock for 30 min, VBNC forms were tested for their capability to infect *A. polyphaga* at 30 °C and 37 °C at MOIs of 10 and 100 and therefore to recover their culturability. Infection by the GFP-modified Lp1-008 was monitored by videomicroscopy. Untreated *Legionella* were detected into amoebae 30 h after the beginning of co-incubation whereas 20 supplementary hours were necessary

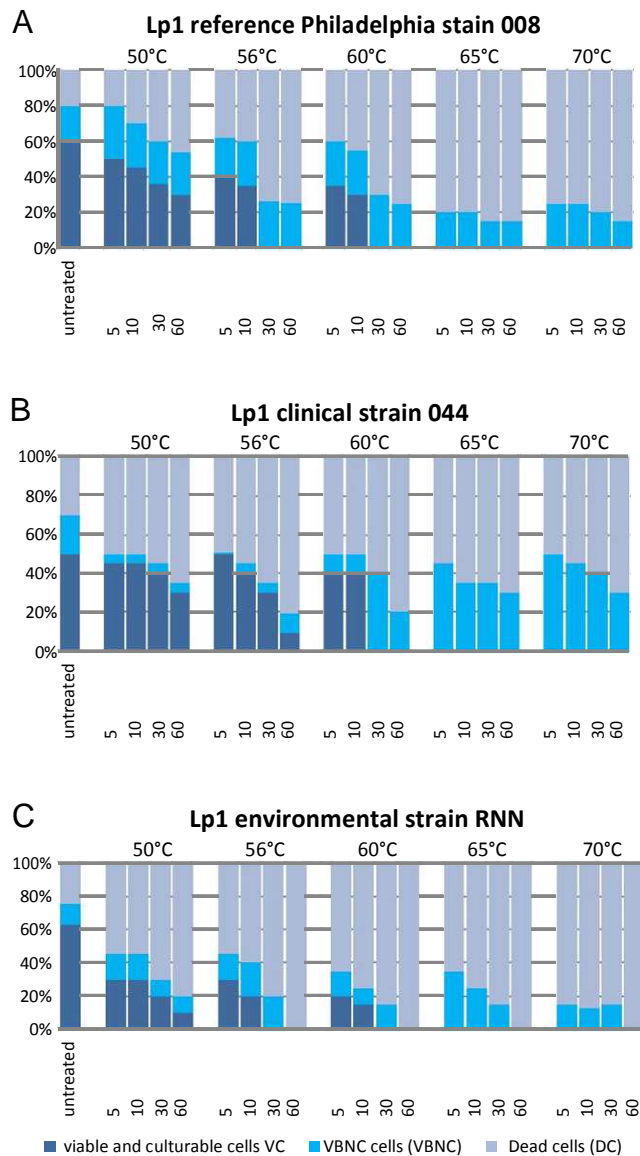


Fig. 2 Distribution of viable and culturable cells (VC), viable and non culturable cells (VBNC), and dead cells (DC) observed after heat shock treatments at 50, 56, 60, 65 and 70 °C for 5, 10, 30 and 60 min. Percentages of different forms were determined using FCA as previously described (Allegra et al. 2008). The profiles shown are the mean of four separate experiments. a *L. pneumophila* reference strain 008; b clinical strain 044; and c environmental strain RNN

to achieve the same result with heat-shocked cells (Fig. 3). As shown in Fig. 4, VBNC forms obtained from Lp1-008 were resuscitated regardless the experimental conditions used although the temperature of incubation seems to influence their recovery in the presence of *A. polyphaga*. At the opposite, Lp1-044 was unable to grow on BCYE media after co-culture with amoeba despite various conditions used to favour its resuscitation. When considering the environmental strain Lp1-RNN, only one experimental condition of contact with *A. polyphaga* (4 days at 37 °C for a MOI of 100) did not allow its recovery.

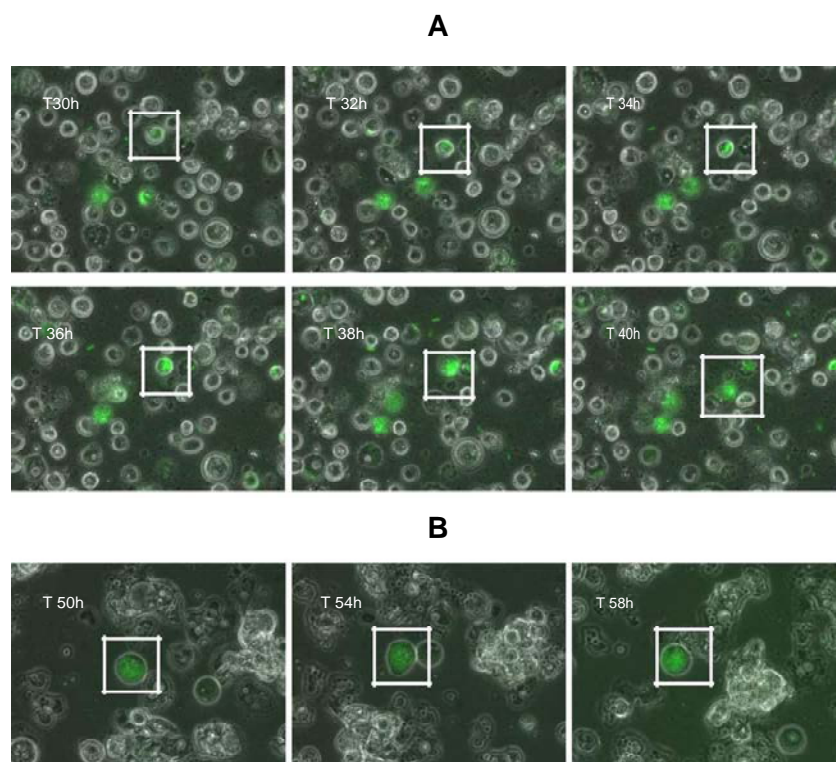
Macrophage-Like Cells Infectivity After VBNC Resuscitation on *A. polyphaga* Amoeba

These experiments were conducted with Lp1-RNN and Lp1-008. Figure 5, panel a, illustrates the presence of VBNC cells and the loss of culturability on BCYE medium when a suspension of Lp1-RNN was heated at 70 °C for 30 and 60 min. Unlike cells submitted to a 30-min heat shock at 70 °C, cells shocked for 60 min were not resuscitated on amoeba (Fig. 5, panel b). Lp1-008 exhibited the same behaviour (data not shown). Treated and untreated bacteria harvested after lysis of amoebae were used to infect macrophage-like cells. As shown in Fig. 5, panel c, Lp1-RNN was the only strain able to infect differentiated U937 macrophage-like cells following resuscitation on *A. polyphaga*. The same results were obtained with differentiated HL-60 macrophage-like cells (data not shown).

Discussion

L. pneumophila is the causative agent of legionellosis, a pneumonia which may occur through aerosols inhalation. In order to prevent outbreaks, surveillance of *Legionella* environmental contamination is mandatory in France for hot sanitary water systems of collective settings such as hospitals, hotels or thermal institutes. Concentrations of *L. pneumophila* cannot exceed 1,000 CFU per liter in hot water systems and even 250 CFU/L for immune-compromised patients. Among possible disinfection processes [27, 8], reaching a temperature of 70 °C during 30 min in all parts of the water system is recommended. We have previously demonstrated that such a disinfection process induced a loss of culturability for several *L. pneumophila* strains [15] and generated VBNC forms in water systems [26]. In the present study, we first investigated the evolution of the physiological state of three *L. pneumophila* strains in response to various heat shocks by the enumeration of VC, DC and VBNC cells. Our data indicate that, for both reference and clinical VBNC populations, they can still be unambiguously detected after a 60-min treatment at 70 °C. However, VBNC forms can no longer be evidenced under the same conditions for the environmental strain tested (in this latter case, they are still observed for a 60-min treatment at 56 °C, and for shorter durations at 60 °C). Within the environment in general and in natural and man-made water systems, the exact role of *L. pneumophila* VBNC state is yet to be elucidated. It was indeed suggested that such a state could be either an adaptive response favouring survival [28, 13] or the consequence of cellular damage leading to cell death [29– 32]. It has been shown that VBNC cells of *Vibrio vulnificus* are protected against a wide variety of stresses (heat, oxidative, osmotic, pH, ethanol, antibiotic and heavy metal) in this state [33].

Fig. 3 Video microscopy monitoring *A. polyphaga* infection by the GFP-modified Lp1-008. **a** Untreated Lp1-008 as control; **b** 70 °C for 30 min heat-generated VBNC forms. Pictures were taken during 12 h, each 2 h (a) or 4 h (b), beginning 30 h (a) or 50 h (b) post-infection



Our results are showing that, as the strength of the stress increases (temperature and duration), more dead cells are generated, and that at least for the environmental strain, this ends up with cell death. VBNC populations were observed for all the strains. For Lp1-044 (clinical strain), “new” VBNC cells were unambiguously produced upon thermal stress (increase in the percentage of VBNC from 25—in untreated cells—to 55 % for a 5-min exposure at 70 °C). However, for both the reference (Lp1-008) and the environmental (Lp1-RNN) strains, no difference in the number of VBNC cells between untreated and heat-shocked cells was observed. We cannot know, at this stage, if “pre-existing” VBNC forms are persisting or if “new” VBNC cells have been generated after heat shock. To date, no tools are available to differentiate pre-existing from induced populations of

VBNC cells. VBNC newly generated by Lp1-044 strain were not resuscitated on amoebae as opposed to those present (pre-existing or new) for Lp1-RNN and Lp1-008. Thus, we cannot exclude the presence of several populations of VBNC cells when comparing untreated and heat-treated cells.

One can thus consider that, for *L. pneumophila* (as it is probably for a large number of non-spore-forming bacteria), VBNC state is a survival strategy which could be effective until a certain point when damages become too detrimental to be tolerated. Considering that (i) many aquatic environments are oligotrophic and (ii) the difficulty to recover *Legionella* from these environments by cultivation, it is tempting to speculate that VBNC forms of *Legionella* are widespread in the environment.

Fig. 4 Colonies counts on BCYE media after co-culture between *L. pneumophila* VBNC (70 °C for 30 min) and *A. polyphaga*. Four experimental conditions were tested (MOIs of 10 and 100 and temperatures of incubation of 30 and 37 °C)

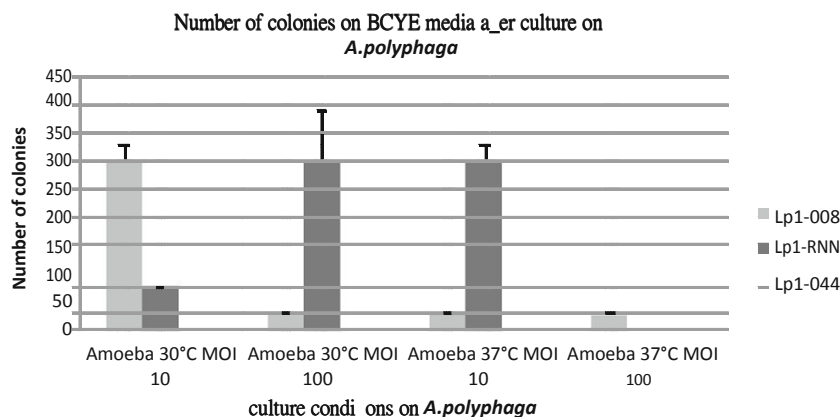
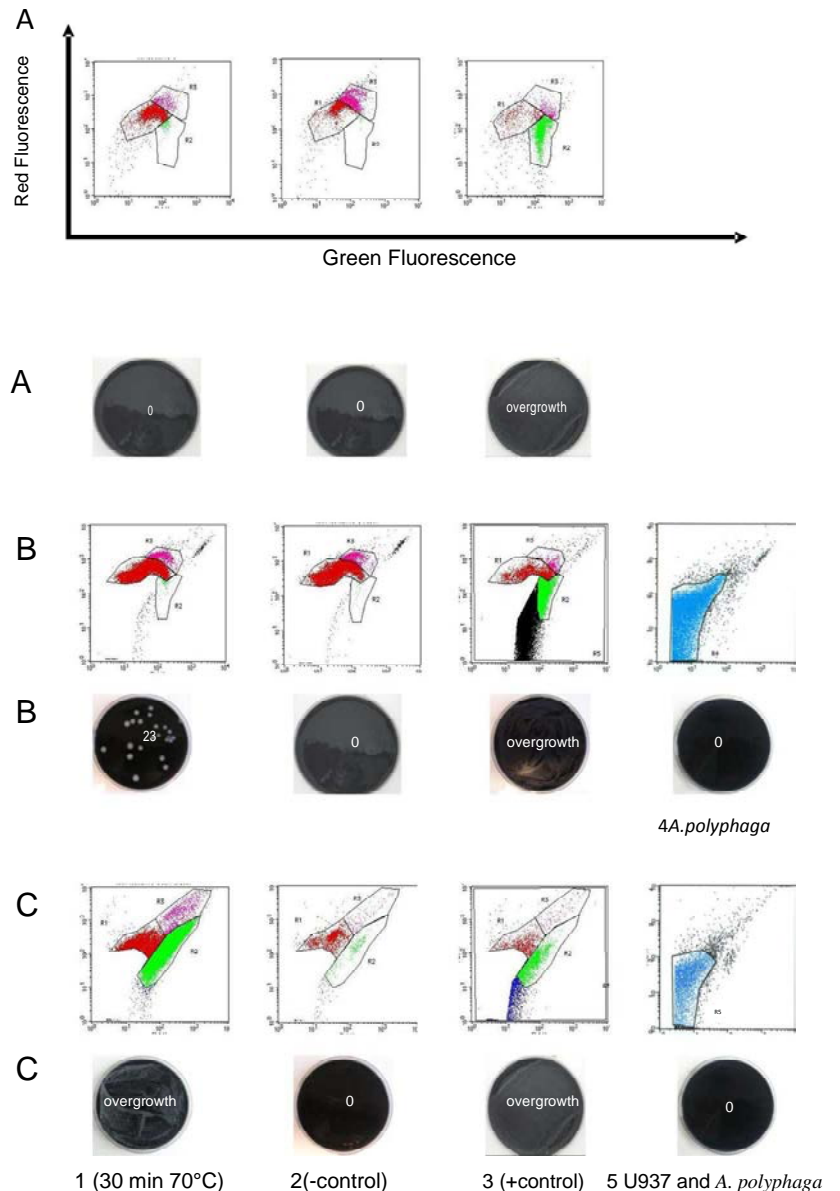


Fig. 5 Viability and cultivability status of a Lp1-RNN suspension assessed by FCA and culture on BCYE solid medium following heat shock (a); following heat shock and after 4 days of culture on amoeba layer panel (b); following heat shock, resuscitation assay on amoeba and co-culture with differentiated U937 macrophage-like cells (c). Heat-shocked suspensions at 70 °C for 30 min (1) and 60 min (2), (3) unshocked cells, (4) amoeba control without bacteria, (5) U937 control with *A. polyphaga* lysate in the absence of bacteria. On cytograms, R1 are DC, R3 are VBNC cells, R2 are VC, R4 is the amoeba population and R5 is U937 population with amoeba lysate. For a better visualisation of bacteria, R4 and R5 populations were subtracted from cytograms on b and c, respectively



Considering that temperatures higher than 60 °C, at each outlet, cannot be reliably maintained in large buildings [10], the pertinence of WHO recommendation is questionable especially if VBNC forms retain their pathogenicity or can be resuscitated and therefore regain pathogenicity. In addition, when exposed to nutritional stress, *L. pneumophila* switches between a non-motile replicative state to a motile transmissible form expressing virulence factors [34, 35]. If extrapolated this to heat shock, VBNC forms could be more infective than their untreated counterparts. Therefore, in the second part of our study, we have tested the capability of VBNC forms present after a heat shock of 30 min at 70 °C to infect and/or resuscitate on *A. polyphaga*. Choosing such a duration and temperature was justified by the following: (i) WHO recommendation for water systems disinfection (see before) and (ii) the fact that

VBNC forms could be observed for all the strains tested. *A. polyphaga* was used in our study because it has previously been reported that VBNC forms generated by different stresses may be culturable after culture on amoebae [18, 15, 19, 16]. In addition, amoebal enrichment as a method to recover *Legionella* from environmental samples [36] may also recover VBNC forms. We found, during this study, that *L. pneumophila* VBNC resuscitation by *A. polyphaga* is dependent on the temperature of incubation and MOIs used. It is however difficult to definitely conclude as only three different strains of *L. pneumophila* and only one amoeba were tested. Surprisingly, no conditions could allow the resuscitation of Lp1-044 VBNC although this strain exhibited a response to heat shock similar to that of Lp1-008 (resuscitated regardless the experimental conditions). VBNC forms of Lp1-RNN, which was found more

sensitive to heat shocks than the other strains, could infect *A. polyphaga*. According to Dey and colleagues, amoebae are not all equally permissive to viable and culturable forms of *L. pneumophila* and our results also suggest that *A. polyphaga* is not equally permissive towards heat-generated VBNC forms [37]. This could also be related to the existence of various VBNC forms, depending on environmental challenges they may face, thus expressing particular genetic factors associated with their protection or their ability to return to the culturable state. Alleron and colleagues have shown that *L. pneumophila* VBNC cells, obtained by monochloramine treatment, were still able to synthesize proteins, some of which were involved in virulence [14].

It has been shown that some amoebae are able to survive after a heat shock at 70 °C [38]. If trying to extrapolate our results to anthropic water systems, the presence of amoeba in sanitary hot water lines [39] may favour the resuscitation of heat-generated *L. pneumophila* VBNC forms potentially conducting to some outbreaks. Whatever the impact of amoeba on VBNC forms, the question of the pathogenicity towards human cells representative of the respiratory system was to be addressed. Unstressed forms of *L. pneumophila* are able to infect eukaryotic cells, particularly macrophages in the lung [2, 40, 5] leading to the apparition of Legionnaires' disease. Similarly, infection of pulmonary alveolar epithelial cells by standard forms of *L. pneumophila* was described in rat alveolar epithelial cells [41]. *Legionella dumoffii* was also able to invade into and proliferate in human alveolar epithelial cells [42]. Indeed, it has been shown that *L. pneumophila* cultivated in amoeba are more pathogenic for alveolar epithelial cells [43]. We therefore evaluated the infectivity of both macrophage-like cells and alveolar epithelial cells by *L. pneumophila* VBNC.

Our results show that, despite the use of several experimental conditions, VBNC forms of the three strains tested are neither capable of resuscitation after culture on the two types of macrophage-like cells nor on alveolar epithelial cells. Phagocytosis of *L. pneumophila* by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages has been demonstrated to be dependent on dot/icm genes. But some loci have been shown to be essential for the intracellular growth in macrophages only and others in amoebae only [44]. This could explain that, in our study, VBNC were only resuscitated on amoebae. When comparing with the capability of VBNC forms obtained from other bacterial species to resuscitate, analysis of the literature shows that VBNC forms of *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, EHEC, ETEC, EPEC, *Shigella flexneri*, and *Salmonella enterica* were successfully converted to the culturable state by co-culture with selected eukaryotic cells [45] whereas *Listeria monocytogenes* VBNC were avirulent in culture on HT-29 cells [46]. The reversion to a culturable state is usually correlated with the kind of stress applied to standard physiological forms and the conditions used to ensure their virulence and recovery [47].

Our results, on the infection of macrophage-like cells following *A. polyphaga* resuscitation of heat-treated VBNC forms, suggest that such VBNC forms may become infectious for humans following a previous interaction with amoebae (at least with *A. polyphaga*).

Concluding Remarks and Perspectives

Our current findings along with previously published studies [48, 39] are showing that *Legionella* spp. can survive in water systems, despite the use of a heat disinfecting process, under a VBNC state. This does not exclude the influence of other environmental parameters such as the presence of biofilm [39] or amoebal cysts [38] that protect *Legionella* strains in such systems. Under certain conditions, amoebae allow the resuscitation of heat-generated *L. pneumophila* VBNC.

Finally, considering our results on the infection of macrophage-like cells following *A. polyphaga* resuscitation of heat-treated VBNC forms, it can be considered that *L. pneumophila* VBNC forms play a critical role for human health in their ability to produce disease.

There is a need to test if other water systems disinfection processes such as chemical treatments or chlorine derivatives or a combination of both generate VBNC forms that may be in such a state that they would have the potential to infect and kill human cells; i.e. if such VBNC forms can be resuscitated on primary culture cells (monocytes isolated from peripheral blood mononuclear cells for example) or if other protozoa, which are known to support *L. pneumophila* growth [40], may also support VBNC resuscitation. One could also attempt to test the pathogenicity of such VBNC forms against guinea pigs through aerosol dissemination.

Acknowledgments We would like to thank Dr. F. Grattard from Centre Hospitalier Universitaire de Saint Etienne, France, for the clinical and environmental strains used during this study. We would like to thank Dr. C. Ginevra and Dr. S. Jarraud from the Centre National de Référence des Légionelles for providing us with the GFP-modified Philadelphia strain. We would like to thank Dr A. Guignandon from Laboratoire de Biologie intégrative de Tissu Osseux, St Etienne, France, for his help in videomicroscopy. We thank Dr O. Delezay for his help in cells culture. T. Epalle, as a PhD student, is supported by a grant from Région Rhône-Alpes, France through the Environment Academic Research Committee. We would like to sincerely thank Région Rhône-Alpes for its support.

References

1. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* 297(22):1197–1203. doi: [10.1056/NEJM197712012972202](https://doi.org/10.1056/NEJM197712012972202)
2. Messi P, Bargellini A, Anacarso I, Marchesi I, de Niederhausern S, Bondi M (2013) Protozoa and human macrophages infection by *Legionella pneumophila* environmental strains belonging to different

- serogroups. *Arch Microbiol* 195(2):89–96. doi: [10.1007/s00203-012-0851-9](https://doi.org/10.1007/s00203-012-0851-9)
3. Albert-Weissenberger C, Cazalet C, Buchrieser C (2007) *Legionella pneumophila*—a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell Mol Life Sci* 64(4):432–448. doi: [10.1007/s00018-006-6391-1](https://doi.org/10.1007/s00018-006-6391-1)
 4. Jules M, Buchrieser C (2007) *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Lett* 581(15):2829–2838. doi: [10.1016/j.febslet.2007.05.026](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.026)
 5. Steinert M, Heuner K, Buchrieser C, Albert-Weissenberger C, Glockner G (2007) *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int J Med Microbiol* 297(7–8):577–587. doi: [10.1016/j.ijmm.2007.03.009](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.009)
 6. Steinert M, Hentschel U, Hacker J (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* 26(2):149–162
 7. Atlas RM (1999) *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ Microbiol* 1(4):283–293
 8. WHO (2004) Gaining Health, the European Strategy for Prevention and Control of Non-communicable Diseases
 9. Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Kendall AM (2002) Literature review—efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res* 36(18):4433–4444
 10. Marchesi I, Marchegiano P, Bargellini A, Cencetti S, Frezza G, Miselli M, Borella P (2011) Effectiveness of different methods to control *Legionella* in the water supply: ten-year experience in an Italian university hospital. *J Hosp Infect* 77(1):47–51. doi: [10.1016/j.jhin.2010.09.012](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.09.012)
 11. Chang CW, Hwang YH, Cheng WY, Chang CP (2007) Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. *J Appl Microbiol* 102(6):1636–1644. doi: [10.1111/j.1365-2672.2006.03195.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03195.x)
 12. Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P (2005) Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev* 11:355–380. doi: [10.1016/S1387-2656\(05\)11011-4](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11011-4)
 13. Oliver JD (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34(4):415–425. doi: [10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x)
 14. Alleron L, Khemiri A, Koubar M, Lacombe C, Coquet L, Cosette P, Jouenne T, Frere J (2013) VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. *Water Res* 47(17):6606–6617. doi: [10.1016/j.watres.2013.08.032](https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.032)
 15. Allegra S, Berger F, Berthelot P, Grattard F, Pozzetto B, Riffard S (2008) Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. *Appl Environ Microbiol* 74(24):7813–7816. doi: [10.1128/AEM.01364-08](https://doi.org/10.1128/AEM.01364-08)
 16. Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M (2008) A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable legionellae that can recover their cultivability. *Appl Environ Microbiol* 74(15):4817–4824. doi: [10.1128/AEM.02899-07](https://doi.org/10.1128/AEM.02899-07)
 17. Hussong D, Colwell R, O'Brien M, Weiss E, Pearson A, Weiner R, Burge W (1987) Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. DTIC Document
 18. Steinert M, Emody L, Amann R, Hacker J (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 63(5):2047–2053
 19. Alleron L, Merlet N, Lacombe C, Frere J (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* 57(5):497–502. doi: [10.1007/s00284-008-9275-9](https://doi.org/10.1007/s00284-008-9275-9)
 20. Harris P, Ralph P (1985) Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol* 37(4):407–422
 21. Furugen M, Higa F, Hibiya K, Teruya H, Akamine M, Haranaga S, Yara S, Koide M, Tateyama M, Mori N, Fujita J (2008) *Legionella pneumophila* infection induces programmed cell death, caspase activation, and release of high-mobility group box 1 protein in A549 alveolar epithelial cells: inhibition by methyl prednisolone. *Respir Res* 9:39. doi: [10.1186/1465-9921-9-39](https://doi.org/10.1186/1465-9921-9-39)
 22. Chang B, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kawamura I, Watanabe H (2004) Expression of IL-6 and TNF-alpha in human alveolar epithelial cells is induced by invading, but not by adhering, *Legionella pneumophila*. *Microb Pathog* 37(6):295–302. doi: [10.1016/j.micpath.2004.10.002](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2004.10.002)
 23. Marra A, Horwitz MA, Shuman HA (1990) The HL-60 model for the interaction of human macrophages with the Legionnaires' disease bacterium. *J Immunol* 144(7):2738–2744
 24. Angst E, Reber HA, Hines OJ, Eibl G (2008) Mononuclear cell-derived interleukin-1 beta confers chemoresistance in pancreatic cancer cells by upregulation of cyclooxygenase-2. *Surgery* 144(1): 57–65. doi: [10.1016/j.surg.2008.03.024](https://doi.org/10.1016/j.surg.2008.03.024)
 25. Seitz M, Zwicker M, Loetscher P (1998) Effects of methotrexate on differentiation of monocytes and production of cytokine inhibitors by monocytes. *Arthritis Rheum* 41(11):2032–2038. doi: [10.1002/1529-0131\(199811\)41:11<2032::AID-ART19>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199811)41:11<2032::AID-ART19>3.0.CO;2-J)
 26. Allegra S, Grattard F, Girardot F, Riffard S, Pozzetto B, Berthelot P (2011) Longitudinal evaluation of the efficacy of heat treatment procedures against *Legionella* spp. in hospital water systems by using a flow cytometric assay. *Appl Environ Microbiol* 77(4):1268–1275. doi: [10.1128/AEM.02225-10](https://doi.org/10.1128/AEM.02225-10)
 27. DGS (2002) DGS/SD7A/SD5C/DHOS/E4 n° 2002/243 Prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé. Bulletin officielle de la santé
 28. Jackson DN, Davis B, Tirado SM, Duggal M, van Frankenhuyzen JK, Deaville D, Wijesinghe MA, Tessaro M, Trevors JT (2009) Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter jejuni* under stress conditions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96(4):377–394. doi: [10.1007/s10482-009-9378-8](https://doi.org/10.1007/s10482-009-9378-8)
 29. Roszak DB, Colwell RR (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 51(3):365–379
 30. Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Kell DB, Young M (2003) Adoption of the transiently non-culturable state—a bacterial survival strategy? *Adv Microb Physiol* 47:65–129
 31. Desnues B, Cuny C, Gregori G, Dukan S, Aguilaniu H, Nystrom T (2003) Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells. *EMBO Rep* 4(4):400–404. doi: [10.1038/sj.embor.embor799](https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor799)
 32. Cuny C, Dukan L, Fraysse L, Ballesteros M, Dukan S (2005) Investigation of the first events leading to loss of culturability during *Escherichia coli* starvation: future nonculturable bacteria form a subpopulation. *J Bacteriol* 187(7):2244–2248. doi: [10.1128/JB.187.7.2244-2248.2005](https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2244-2248.2005)
 33. Nowakowska J, Oliver JD (2013) Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol Ecol* 84(1):213–222. doi: [10.1111/1574-6941.12052](https://doi.org/10.1111/1574-6941.12052)
 34. Hammer BK, Swanson MS (1999) Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol Microbiol* 33(4):721–731
 35. Edwards RL, Dalebroux ZD, Swanson MS (2009) *Legionella pneumophila* couples fatty acid flux to microbial differentiation and virulence. *Mol Microbiol* 71(5):1190–1204. doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.06593.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06593.x)
 36. Lamoth F, Greub G (2010) Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia. *FEMS Microbiol Rev* 34(3):260–280. doi: [10.1111/j.1574-6976.2009.00207.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00207.x)
 37. Dey R, Bodennec J, Mameri MO, Pernin P (2009) Free-living fresh-water amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett* 290(1):10–17. doi: [10.1111/j.1574-6968.2008.01387.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01387.x)

38. Loret JF, Jousset M, Robert S, Saucedo G, Ribas F, Thomas V, Greub G (2008) Amoebae-resisting bacteria in drinking water: risk assessment and management. *Water Sci Technol* 58(3):571–577. doi: [10.2166/wst.2008.423](https://doi.org/10.2166/wst.2008.423)
39. Farhat M, Moletta-Denat M, Frere J, Onillon S, Trouilhe MC, Robine E (2012) Effects of disinfection on *Legionella* spp., eukarya, and biofilms in a hot water system. *Appl Environ Microbiol* 78(19): 6850–6858. doi: [10.1128/AEM.00831-12](https://doi.org/10.1128/AEM.00831-12)
40. Steinert M (2011) Pathogen-host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Semin Cell Dev Biol* 22(1):70–76. doi: [10.1016/j.semcdb.2010.11.003](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.11.003)
41. Mody CH, Paine R, Shahrabadi MS, Simon RH, Pearlman E, Eisenstein BI, Toews GB (1993) *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. *J Infect Dis* 167(5):1138–1145
42. Maruta K, Miyamoto H, Hamada T, Ogawa M, Taniguchi H, Yoshida S (1998) Entry and intracellular growth of *Legionella dumoffii* in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 157(6 Pt 1): 1967–1974. doi: [10.1164/ajrccm.157.6.9710108](https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.6.9710108)
43. Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* 62(8):3254–3261
44. Gao LY, Harb OS, Kwaik YA (1998) Identification of macrophage-specific infectivity loci (mil) of *Legionella pneumophila* that are not required for infectivity of protozoa. *Infect Immun* 66(3):883–892
45. Senoh M, Ghosh-Banerjee J, Ramamurthy T, Colwell RR, Miyoshi S, Nair GB, Takeda Y (2012) Conversion of viable but nonculturable enteric bacteria to culturable by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiol Immunol* 56(5):342–345. doi: [10.1111/j.1348-0421.2012.00440.x](https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00440.x)
46. Lindback T, Rottenberg ME, Roche SM, Rorvik LM (2010) The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Vet Res* 41(1):8. doi: [10.1051/vetres/2009056](https://doi.org/10.1051/vetres/2009056)
47. Wai SN, Mizunoe Y, Takade A, Yoshida S (2000) A comparison of solid and liquid media for resuscitation of starvation- and low-temperature-induced nonculturable cells of *Aeromonas hydrophila*. *Arch Microbiol* 173(4):307–310
48. Farhat M, Trouilhe MC, Briand E, Moletta-Denat M, Robine E, Frere J (2010) Development of a pilot-scale 1 for *Legionella* elimination in biofilm in hot water network: heat shock treatment evaluation. *J Appl Microbiol* 108(3):1073–1082. doi: [10.1111/j.1365-2672.2009.04541.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04541.x)



Research in Microbiology xx (2015) 1e5



www.elsevier.com/locate/resmic

Brief note

Monitoring of *Legionella pneumophila* viability after chlorine dioxide treatment using flow cytometry

Pascale Mustapha¹, Thibaut Epalle¹, S'everine Allegra, Françoise Girardot, Olivier Garraud, Serge Riffard*

Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP) EA3064, SFR143, 15 Rue Ambroise Paré, University of Lyon, 42023 Saint Etienne Cedex 02, France

Received 6 October 2014; accepted 25 January 2015

Available online •••

Abstract

The viability of three *Legionella pneumophila* strains was monitored after chlorine dioxide (ClO₂) treatment using a flow cytometric assay. Suspensions of *L. pneumophila* cells were submitted to increasing concentrations of ClO₂. Culturable cells were still detected when using 4 mg/L, but could no longer be detected after exposure to 6 mg/L of ClO₂, although viable but not culturable (VBNC) cells were found after exposure to 4e5 mg/L of ClO₂. When testing whether these VBNC were infective, two of the strains were resuscitated after co-culture with *Acanthamoeba polyphaga*, but neither of them could infect macrophage-like cells.

© 2015 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Legionella*; VBNC; Chlorine dioxide; Flow cytometry

1. Introduction

Legionella pneumophila is an intracellular bacterial pathogen commonly present in natural aquatic environments and sanitary water-distributing systems [1]. It is well established that inhaled *L. pneumophila*-contaminated aerosols can lead to severe and fatal pneumonia, also known as legionellosis or Legionnaire's disease, during which the bacterium multiplies intracellularly after invading alveolar macrophages [2].

Chlorine dioxide (ClO₂) has been widely used as an oxidizing agent for disinfecting man-made water systems such as hospitals, spas and cooling towers, due to its physical and chemical properties that resemble those of chlorine [3]. ClO₂

has been used to control *Legionella* in water supplies [4e6]. However, *Legionella* can resist stressful conditions such as high temperature and chlorine disinfection treatments by entering a viable but not culturable state (VBNC) during which it remains potentially virulent [7e9]. Under suitable conditions, mainly inside amoebae which are their natural hosts, VBNC cells of *Legionella* can be resuscitated and consequently recover their cultivability [10,11] and even their infectivity [12].

The aim of this study was to assess *Legionellae* viability (viable and culturable, viable but not culturable and dead cells) after chlorine dioxide treatment using flow cytometry. In addition, the ability of VBNC cells to be resuscitated after either *Acanthamoeba polyphaga* or macrophage-like cell (HL-60 cells) infection was examined.

2. Materials and methods

Three strains of *L. pneumophila* were used throughout this study. *L. pneumophila* 008 (*Lp1-008*), a fluorescent (green

* Corresponding author.

E-mail addresses: Pascale.mustapha@univ-st-etienne.fr (P. Mustapha), Thibaut.epalle@univ-st-etienne.fr (T. Epalle), Severine.allegra@univ-st-etienne.fr (S. Allegra), Françoise.girardot@univ-st-etienne.fr (F. Girardot), Olivier.garraud@univ-st-etienne.fr (O. Garraud), Serge.riffard@univ-st-etienne.fr (S. Riffard).

¹ Pascale Mustapha and Thibaut Epalle contributed equally to the work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2015.01.004>

0923-2508/© 2015 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

fluorescent protein) strain was obtained from the National Reference Center of *Legionella* (Lyon, France). *L. pneumophila* RNN (*Lp1-RNN*), an environmental strain, and *L. pneumophila* 044 (*Lp1-044*), a clinical strain, were obtained from the Centre Hospitalier Universitaire de Saint Etienne, France. These strains have shown the capacity to generate VBNC forms after heat shock treatment [12,13].

A pure and highly concentrated chlorine dioxide solution of 3500 mg/L was first prepared using the XzioX 1L test kit (Ximax, France) according to the manufacturer's instructions. Chlorine dioxide treatment was performed for 1 h at room temperature at concentrations ranging from 0.1 to 10 mg/L. Treatment was stopped by addition of sterile sodium thiosulfate (0.1 M).

Upon exposure to ClO₂, and in order to confirm the VBNC state, *L. pneumophila* cultivability was assessed on buffered charcoal yeast extract agar (BCYE) media plates. BCYE is a routine bacteriologic medium commonly used for isolation of *L. pneumophila* [14]. Bacteria in the VBNC state fail to grow on BCYE. However, upon resuscitation, they recover their cultivability and can be plate-counted [15].

Flow cytometric assays (FCAs) were performed on a BD FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences) as previously described by Allegra et al. [13]. For *Lp1-RNN* and *Lp1-044* strains, double staining combining Syto 9 (which stains viable cells) and propidium iodide (PI) (that stains cells with compromised membranes, including VBNC and dead cells) was used. For the *Lp1-008* strain, only PI was used for dead cell staining, as this strain produces a GFP. Unstained bacteria and double staining of sterilized water were used as negative controls to define background noise. Infection experiments of ClO₂-treated or untreated *L. pneumophila* cells with *A. polyphaga* or with HL-60 were performed as previously described [12].

1. Results

Viable and culturable cells were systematically detected after treatment using less than 4 mg/L ClO₂. The switch between the culturable and non-culturable state occurred between a concentration of 4 and 5 mg/L of ClO₂. Above these concentrations, no colonies of any of the three strains were enumerated on BCYE culture media (data not shown).

Fig. 1 shows FCA dot plots patterns generated before and after ClO₂ treatment. VBNC cells were detected (in the R3 region). Percentages of VBNC cells differed from one strain to another (Fig. 1). For *Lp1-RNN* and *Lp1-044* strains, only VBNC and dead cell populations remained after treatment with 4 mg/L of ClO₂. For the *Lp1-008* strain, however, greater concentrations of ClO₂ up to 7 mg/L were necessary to generate VBNC cells, whereas 10 mg/L lysed all bacteria (data not shown). Therefore, cells obtained using 6e7 mg/L of ClO₂ were used in order to evaluate their infectivity against amoeba and macrophage-like cells.

None of the ClO₂ treated strains was able to multiply inside HL-60 cells. The *Lp1-008* strain treated with ClO₂ at 6

and 7 mg/L recovered its cultivability after passage inside *A. polyphaga*. Likewise, the *Lp1-RNN* strain treated with ClO₂ at 4 mg/L also recovered its cultivability after passage inside *A. polyphaga* (Table 1). Whatever the ClO₂ concentration used, the *Lp1-044* strain never recovered its cultivability. Considering that no resuscitation was observed with 6e7 mg/L, *Lp1-044* and *Lp1-RNN* obtained after treatment with higher concentrations of ClO₂ were not tested for the resuscitation assay.

2. Discussion

Consistent with previous reports, our study confirms the importance of the flow cytometric tool in assessing the viability of bacteria based on outer cell membrane integrity [13,16].

ClO₂ was used in an attempt to eradicate *L. pneumophila* in hospital water systems [5]. In almost all of these studies, the concentration of *L. pneumophila* decreased significantly after ClO₂ introduction into both cold and hot water systems using target concentrations of 0.5e0.7 mg/L. Except for a 17-month period study in a hospital water system where ClO₂ treatment effectively removed *Legionella* species from the network [5,17], eradication of *L. pneumophila* was never obtained. Moreover, concentrations of ClO₂ of 0.2e0.6 mg/L at the water outlets resulted in the occurrence of 12 cases of Legionnaires' disease in a hospital (with persistent levels of *L. pneumophila* of 10³e10⁴ CFU/L) [18].

In the United States, ClO₂ is approved by the Environmental Protection Agency for use as a drinking water disinfectant at a maximum level of 0.8 mg/L. The standard dosage, however, is set at 1 mg/L [19]. In Europe as well, ClO₂ can be used in a continuous disinfection process in sanitary water supplies at a concentration of 1 mg/L [20]. Higher concentrations present a risk for consumers (cancer) and for pipe sections (corrosion).

In our study, ClO₂ treatment at levels of 0.1e1 mg/L were not sufficient to eradicate any of the three strains tested (data not shown). Instead, somewhat higher concentrations were needed to achieve complete eradication of the bacteria, for two main reasons. First, the study was conducted *in vitro* using smaller water volumes that were highly concentrated with bacteria. Therefore, our model cannot directly mimic hospital water chain supplies in which ClO₂ is injected at a constant and continuous debit. Second, the aim of this study was to assess the viability of *L. pneumophila* after ClO₂ shock treatment. This involves the use of higher concentrations of the disinfectant, which also enables complete eradication of *Legionellae*.

Indeed, Makin et al. showed that eradication of culturable *Legionellae* in a water system was achieved using 3e5 mg/L of ClO₂, but a failure in the ClO₂ injection system resulted in re-emergence of *Legionellae* within 4 days [21]. This re-emergence was probably due to the presence of VBNC forms of *Legionellae* in the network.

Our study demonstrates the presence of VBNC forms of *L. pneumophila* following ClO₂ shock treatment. Complete

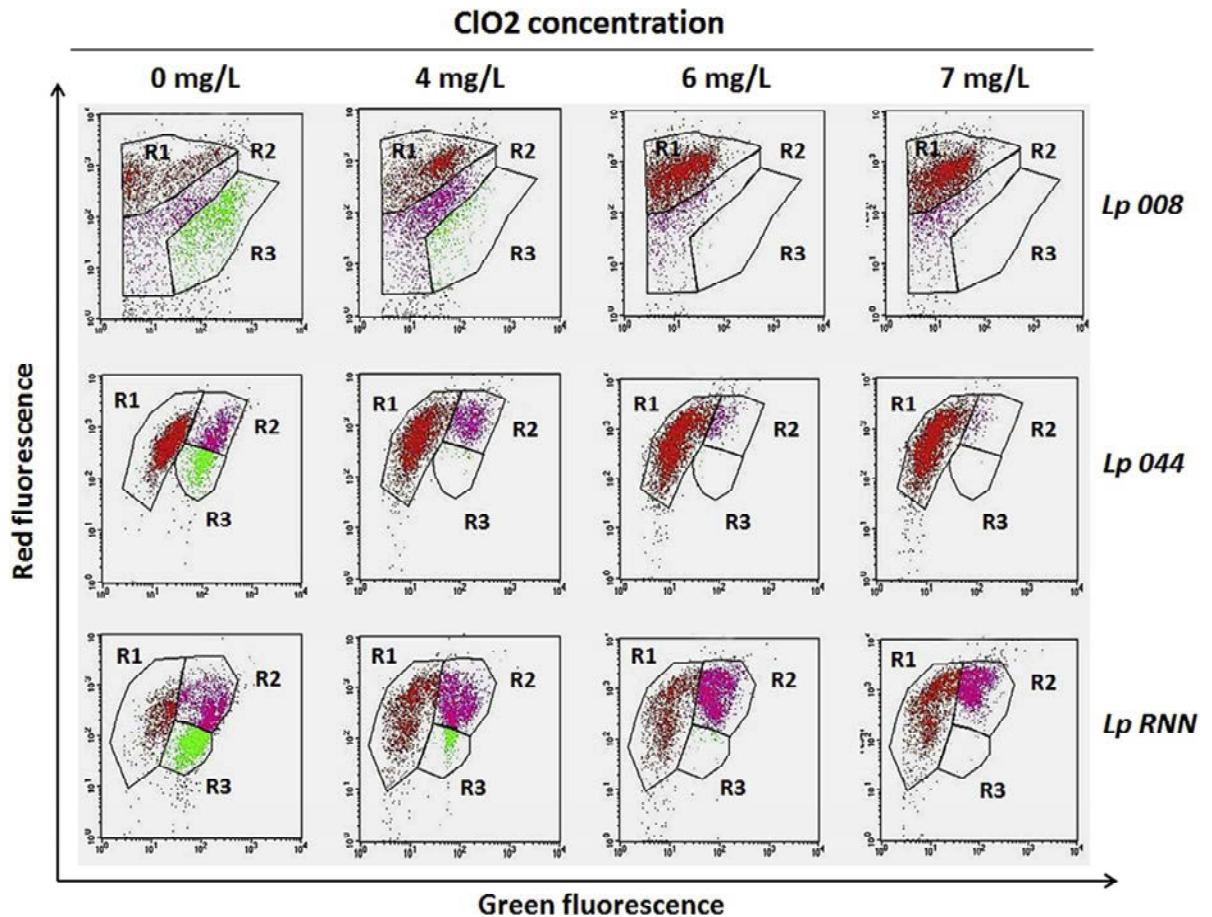


Fig. 1. Flow cytometry dot plots for *L. pneumophila* Lp1-008, Lp1-RNN and Lp1-044 strains before and after chlorine dioxide treatments at 0, 4, 6 and 7 mg/L. Bacterial suspensions (2.10^8 bacteria/mL) were treated with chlorine dioxide for 1 h at room temperature. Flow cytometric measurements were performed using a BD FACS Calibur instrument (Becton Dickinson Biosciences). The bacteria were visualized on a dot plot of PI red fluorescence (FL3) versus SYTO 9 green fluorescence (FL1) for Lp1-044 and Lp1-RNN. For Lp1-008 which expresses GFP, only PI was used. Region 1 (R1, in red) corresponds to dead cells, Region 2 (R2, in green) corresponds to viable and culturable bacteria, and region 3 (R3, in magenta) corresponds to VBNC *Legionellae*. The percentages of dead cells in R1 region were, respectively: 25%, 50%, 43% and 57% for the Lp1 - RNN strain; 61%, 75%, 91% and 94% for the Lp1 - 044 strain; and 37%, 49%, 82% and 79% for the Lp1-008 strain. The percentages of viable and culturable cells (R2 region) were, respectively: 28%, 7%, 1% and 0% for the Lp1-RNN strain; 17%, 1%, 0% and 0% for the Lp1-044 strain; and 29%, 8%, 0% and 0% for the Lp1-008 strain. The percentages of viable but not culturable cells were, respectively: 42%, 41%, 53% and 41% for the Lp1-RNN strain; 21%, 21%, 6% and 3% for the Lp1-044 strain; and 24%, 37%, 15% and 17% for the Lp1-008 strain.

eradication of viable and culturable *L. pneumophila* cells (initial bacterial concentrations of 10^8 CFU/mL) required 6 mg/L of ClO_2 with persisting VBNC cells up until 10 mg/L, except for Lp1-008, which was completely lysed.

Several studies have shown that VBNC *L. pneumophila* generated by starvation or chemical disinfectants can be cultured inside amoebae [7,10,11]. We thus decided to evaluate the ability of the VBNC cells obtained to be resuscitated and after co-culture with *A. polyphaga* or HL60 cells. The results are representative of 3 independent experiments.

Table 1

L. pneumophila cell growth after direct chlorine dioxide treatment and co-culture with *A. polyphaga* or HL60 cells.

	Lp1-008			Lp1-RNN			Lp1 - 044		
	Direct	<i>A. polyphaga</i>	HL60 cells	Direct	<i>A. polyphaga</i>	HL60 cells	Direct	<i>A. polyphaga</i>	HL60 cells
<i>ClO₂</i> treatment dose									
0 ppm	b	b	b	b	b	b	b	b	b
4 ppm	b/—	b	e	e	b	e	e	e	e
6 ppm	e	b	e	e	e	e	e	e	e
7 ppm	e	b	e	e	e	e	e	e	e

bGrowth; -no growth.

L. pneumophila cell growth was evaluated by plate-counting on solid BCYE medium after direct chlorine dioxide treatment at 0, 4, 6 and 7 mg/L

after either *Acanthamoeba polyphaga* (*A. polyphaga*) or macrophage-like cell (HL-60 cells) infection.

None of the *L. pneumophila* strains was resuscitated after co-culture with HL-60 cells.

To date, only a few studies have reported resuscitation of intestinal VBNC bacteria (e.g. *Vibrio cholera* and enteric bacteria) after *in vitro* co-culture with intestinal cells such as Caco-2 cells [22]. Generally speaking, VBNC form resuscitation seems to be correlated with the stress applied and the conditions used to ensure their recovery [23].

Nonetheless, resuscitation of ClO₂-generated VBNC *Legionella* by *A. polyphaga* occurred for two of the three treated strains (*Lp1-RNN* and *Lp1-008*), but not systematically at the same concentrations (4 vs 6e7 mg/L).

These findings are similar to those observed when the same *L. pneumophila* strains were submitted to heat shock treatments of 30 min at 70 °C [12], except for *Lp1-RNN*. This environmental strain seems to be more strongly affected by ClO₂ treatment than *Lp1-008*, whereas both strains responded similarly to heat shock.

The mechanisms of action of ClO₂ against *Legionella* are not fully elucidated. However, it was shown that ClO₂ induces protein synthesis disruption in bacteria [24]. In addition, free chlorine resulting from ClO₂ decomposition in water can alter the cells at several levels, including outer membrane, ATP production inhibition and nucleic acid damage [25,26]. These mechanisms are roughly identical to those observed after heat shock. Similarly to heat shock, resuscitation upon ClO₂ treatment is a strain-dependent process.

In conclusion, our results confirm that flow cytometry is a highly useful tool in assessing *L. pneumophila* viability and detection of its VBNC state. They also show that ClO₂ effectively reduces the cultivability, but not the viability, of *L. pneumophila* as VBNC forms persist. Resuscitation of VBNC forms of *L. pneumophila* after co-culture with *A. polyphaga* is not systematic.

Conflict of interest

The authors disclose no conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. F. Grattard from the Centre Hospitalier Universitaire de Saint Etienne, France, for the clinical and environmental strains used during this study. We thank Dr. C. Ginevra and Dr. S. Jarraud from the Centre National de Référence des Légionelles for providing us with the GFP-modified Philadelphia strain. T. Epalle, as a PhD student, is supported by a grant from the Région Rhône-Alpes, France through the Environment Academic Research Committee. We sincerely thank the Région Rhône-Alpes for its support.

References

- [1] Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:506e26.
- [2] Steinert M, Hentschel U, Hacker J. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:149e62.
- [3] Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Kendall AM. Literature review of efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. *Water Res* 2002;36:4433e44.
- [4] Lin YE, Stout JE, Yu VL. Controlling Legionella in hospital drinking water: an evidence-based review of disinfection methods. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011;32:166e73.
- [5] Srinivasan A, Bova G, Ross T, Mackie K, Paquette N, Merz W, et al. A 17-month evaluation of a chlorine dioxide water treatment system to control Legionella species in a hospital water supply. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:575e9.
- [6] Zhang Z, McCann C, Stout JE, Piesczynski S, Hawks R, Vidic R, et al. Safety and efficacy of chlorine dioxide for Legionella control in a hospital water system. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;28:1009e12.
- [7] Alleron L, Merlet N, Lacombe C, Frere J. Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* 2008;57:497e502.
- [8] Allegra S, Girardot F, Grattard F, Berthelot P, Helbig JH, Pozzetto B, et al. Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve *Legionella pneumophila* serogroup 1 recovery from environmental samples. *J Appl Microbiol* 2011;110(4):952e61.
- [9] Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol* 2014;5:258.
- [10] Ducret A, Chabaliere M, Dukan S. Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiol* 2014;14:3.
- [11] Steinert M, Emody L, Amann R, Hacker J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:2047e53.
- [12] Epalle T, Girardot F, Allegra S, Maurice-Blanc C, Garraud O, Riffard S. Viable but not culturable forms of *Legionella pneumophila* generated after heat shock treatment are infectious for macrophage-like and alveolar epithelial cells after resuscitation on acanthamoeba polyphaga. *Microb Ecol* 2015;69(1):215e24.
- [13] Allegra S, Berger F, Berthelot P, Grattard F, Pozzetto B, Riffard S. Use of flow cytometry to monitor Legionella viability. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:7813e6.
- [14] Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, et al. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 1979;10:437e41.
- [15] Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 2005;43. Spec No:93e100.
- [16] Gao MS, Wilks SA, Azevedo NF, Vieira MJ, Keevil CW. Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but non-cultivable *Legionella pneumophila*. *Microb Ecol* 2009;58:56e62.
- [17] Walker JT, Mackerness CW, Mallon D, Makin T, Williets T, Keevil CW. Control of *Legionella pneumophila* in a hospital water system by chlorine dioxide. *J Ind Microbiol* 1995;15:384e90.
- [18] Ricci ML, Dell'Eva I, Scaturro M, Baruchelli P, Fabbri L, Ottaviani M, et al. A four-year experience of a chlorine dioxide treatment for the control of Legionella in a hospital water system. *ISTISAN Congr* 2005;05:18.
- [19] Agency EP. National primary drinking water regulations. *Fed Regist* 2002;67.
- [20] DGS, DGS/SD7A/SD5C/DHOS/E4 n° 2002/243. Prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé. *Bull Off la Santé* 2002;18. SP4 435: 1819.
- [21] Makin T. Control of Legionella in domestic water systems and potential energy savings resulting from the control of legionellae with chlorine dioxide. In: 15th IFHE Congress, Edinburgh, United Kingdom; 1998.
- [22] Senoh M, Ghosh-Banerjee J, Ramamurthy T, Colwell RR, Miyoshi S, Nair GB, et al. Conversion of viable but nonculturable enteric bacteria to culturable by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiol Immunol* 2012;56:342e5.
- [23] Wai SN, Mizunoe Y, Takade A, Yoshida S. A comparison of solid and liquid media for resuscitation of starvation- and low-temperature-induced nonculturable cells of *Aeromonas hydrophila*. *Arch Microbiol* 2000;173:307e10.
- [24] Benarde MA, Snow WB, Olivieri VP, Davidson B. Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide. *Appl Microbiol* 1967;15:257e65.
- [25] McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:147e79.
- [26] Dukan S, Belkin S, Touati D. Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid. *Arch Biochem*



AFM, CLSM and EIS characterization of the immobilization of antibodies on indium–tin oxide electrode and their capture of *Legionella pneumophila*

Mina Souiri ^a, Nesrine Blel ^{a,b}, Dejla Sboui ^{a,c}, Lotfi Mhamdi ^a, Thibaut Epalle ^c,
Ridha Mzoughi ^b, Serge Riffard ^{c,n,1}, Ali Othmane ^{a,1}

^a Laboratory Advanced Materials and Interfaces, Faculty of Medicine, 5019 Monastir, Tunisia

^b Regional Laboratory of Hygiene, University Hospital Farhat Hached, 4000 Sousse, Tunisia

^c Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP), EA 3064, SFR 143, University of Lyon, F42023, France

article info

Article history:

Received 17 May 2013

Received in revised form

24 September 2013

Accepted 26 September 2013

Available online 15 October 2013

Keywords:

Immunosensor

Antibody immobilization

Electrochemical impedance spectroscopy

Detection

Legionella pneumophila

abstract

The microscopic surface molecular structures and properties of monoclonal anti-*Legionella pneumophila* antibodies on an indium–tin oxide (ITO) electrode surface were studied to elaborate an electrochemical immunosensor for *Legionella pneumophila* detection. A monoclonal anti-*Legionella pneumophila* antibody (MAb) has been immobilized onto an ITO electrode via covalent chemical bonds between antibodies amino-group and the ring of (3-Glycidoxypropyl) trimethoxysilane (GPTMS).

The functionalization of the immunosensor was characterized by atomic force microscopy (AFM), water contact angle measurement, cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in the presence of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as a redox probe. Specific binding of *Legionella pneumophila* sgp 1 cells onto the antibody-modified ITO electrode was shown by confocal laser scanning microscopy (CLSM) imaging and EIS. AFM images evidenced the dense and relatively homogeneous morphology on the ITO surface. The formation of the complex epoxysilane-antibodies acting as barriers for the electron transfer between the electrode surface and the redox species in the solution induced a significant increase in the charge transfer resistance (R_{ct}) compared to all the electric elements.

A linear relationship between the change in charge transfer resistance (ΔR_{ct}) after immunoreactions – R_{ct} control) and the logarithmic concentration value of *L. pneumophila* was observed in the range of 5×10^1 – 5×10^4 CFU mL⁻¹ with a limit of detection 5×10^1 CFU mL⁻¹.

The present study has demonstrated the successful deposition of an anti-*L. pneumophila* antibodies on an indium–tin oxide surface, opening its subsequent use as immuno-captor for the specific detection of *L. pneumophila* in environmental samples.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Legionella are ubiquitous in natural and man-made water ecosystems [1]. *Legionella pneumophila* is the major causative agent of legionnaires' disease, a pneumonia-like illness with a case/fatality ratio of 20% [2,3]. Transmission to humans from the environment occurs through contaminated aerosols [4]. Detection of *Legionella* in environmental samples can be achieved through standardized methods: cultivation (AFNOR T90-431 or ISO 11731)

and PCR (AFNOR T90-471). Both methods are hampered either by their low sensitivity and the time needed to complete the analysis (cultivation) or by their cost and inefficiency to discriminate between live and dead bacteria (PCR). Several attempts have been made to purpose other detection tools such as flow cytometry for instance in a wish to identify viable but not culturable forms of *L. pneumophila* [5,6] but this method remains technically demanding. The use of specific antibodies (immunosensors) may be seen as alternative tools for *Legionella* detection. Such methods have been proposed to increase the recovery rates from complex plurimicrobial samples [7], or to extend the detection range to other *Legionella* species [8], a few antibodies being available for such purposes.

Antibodies, on these sensors, are usually immobilized through organic covalent bonds on various oxide surfaces such as SiO₂, Al₂O₃, SnO₂, and TiO₂ [9]. Immobilization of biomolecules such as

ⁿ Correspondence to: Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP), EA 3064, SFR 143, Faculté de Médecine J. Lisfranc, Université Jean Monnet, 15 rue Ambroise Paré, F42023, France. Tel.: +33 4 77 42 14 67; fax: +33 4 77 42 14 86.

E-mail address: serge.riffard@univ-st-etienne.fr (S. Riffard).

¹ Contributed equally to the work.

antibodies has been recently expended to ITO [10]. Although ITO surfaces are stable, transparent and conductive making them suitable for the design of several applications [11], the reproducibility of the results is strongly correlated to the cleaning and functionalization process [12,13].

Depending on transducers, detection of Legionella using electrochemical impedance spectroscopy [14,15], surface plasmon resonance or optical waveguide light mode spectroscopy [16–19] are still hampered by a low sensitivity probably due to the use of low affinity antibodies [14–19] or by the fact that so far only DNA detection was achieved [20] but not direct sensing of Legionella bacteria cells. In addition, discriminating between living and dead bacteria by choosing a redox probe that can freely transverse across the bacterial cell membrane and probe the cell activity may be useful [20].

Here, we characterized a rapid, miniaturized low-cost electrochemical system that uses an indium–tin oxide (ITO) electrode in combination with a specific monoclonal antibody previously tested for its very high efficiency in recovering *L. pneumophila* serogroup 1 strains from environmental samples [21].

2. Material and methods

2.1. Chemicals, antibodies and ITO electrodes

An epoxysilane compound, (3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilane, was purchased from Aldrich (St. Louis MO). Carbon tetrachloride USP-NF was from Panreac Quimica SA Barcelona (Espana). Potassium ferrocyanide trihydrate ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$), potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), disodium hydrogen orthophosphate and potassium dihydrogen orthophosphate were received from Sigma-Aldrich (France). Absolute ethanol from Carlo Erba (France), Hydrogen peroxide (30%) and ammonium hydroxide (28%) were obtained from Prolabo (France). All reagents were of analytical grade and ultrapure water (resistance $18.2 M\Omega cm^{-1}$) produced by a Millipore Milli-Q system (MilliQ academic, Millipore).

A mouse monoclonal antibody (MAb), DP-Lp1-O2, raised against Legionella-specific epitope of the LPS protein and taken from the Dresden Legionella MAb panel [22] was used. The DP-Lp1-O2 antibody does not recognize all the *L. pneumophila* serogroups [23] but we have previously shown its ability to detect a large number of *L. pneumophila* serogroup 1 strains [21] although no detection of non-Legionella species including those frequently co-existing with *L. pneumophila* in water samples [24] could be observed when using it for ELISA [22] or immuno-magnetic separation (IMS) purposes [21].

Phosphate buffer saline solution ($0.16 mol L^{-1}$, pH 7.2) was prepared with Na_2HPO_4 and KH_2PO_4 . Tin-doped indium oxide on glass (ITO) which has a surface resistance $\approx 200 \Omega$, was cut into small pieces of pre-defined geometric area with dimensions $1 cm \times 1 cm$ and $1 mm$ thickness, used as working electrodes.

2.2. Preparation of calibrated suspensions of Legionella

Calibrated suspensions were made using a wild *L. pneumophila* strain isolated from an environmental sample (water) in Tunisia. It was stored at $4^\circ C$ in Cryobank tubes (Mast Diagnostic, Amiens, France). The strain was grown for 3 days on BCYE α medium (buffered charcoal yeast extract agar) at $37^\circ C$ before being used in the experiments.

All suspensions were prepared by resuspending Legionella colonies into sterile saline buffer (0.9% NaCl). The optical density (OD) of the bacterial culture was measured at 600 nm and serial dilutions (spiked samples) were used to study the interaction of the bacterium with the electrode. Real numbers of bacteria in each dilution were obtained by plating some aliquots on BCYE agar

media (in duplicates). Bacterial numbers were expressed as of Colony Forming Units (CFU) per mL.

2.3. Electrode modification and immobilization of the antibodies

Prior to use, the ITO coated glass were ultrasonically cleaned using acetone, absolute ethanol, and distilled water for 15 min each, and dried with nitrogen flow. Then it was immersed into a basic solution 5 M of KOH for 1 h and rinsed thoroughly with copious amounts of ultra-pure water. The electrodes were also cleaned chemically by immersion in RCA solution (NH_4OH (28%), H_2O_2 (30%), H_2O ; 1:4:20 v/v) at $60^\circ C$ for 30 min followed by rinsing with ultra-pure water and dried with nitrogen flow. A Piranha solution (3:7 v/v of H_2O_2 and H_2SO_4) was applied for 1 min. Finally, the electrodes were washed extensively with water, absolute ethanol and dried under a stream of nitrogen before the silanization step.

Silanization was conducted by immersing the cleaned ITO electrode in 2% epoxysilane (20 mL $CCl_4/400 mL$ silane) solution overnight at room temperature. Electrodes were then rinsed with absolute ethanol and with pure carbon tetrachloride to remove unbound epoxysilane from the surface and the modified electrodes were then dried 2 h in an oven at $120^\circ C$.

Then, 20 mL of monoclonal antibody ($2.36 mg mL^{-1}$) were added on the ITO electrode, incubated 2 h at $4^\circ C$ and washed with the PBS ($0.16 M$, pH 7.2). To block the non-specific binding sites on the electrode surface, 20 mL of BSA 1% were added onto the electrode surface, incubated 1 h at $4^\circ C$ and washed with PBS. The monoclonal antibody modified electrode (ITO-Epoxy-MAb) was stored for further use at $4^\circ C$. The way to assemble the epoxysilane monolayer and the immobilization of the anti-*L. pneumophila* antibodies is shown in Fig. 1.

2.4. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements

Impedance measurements were performed using the Volta Lab (PGZ 301) impedance analyzer (Radiometer Analytical SA, Villeurbanne, France) with a conventional electrochemical setup. The three electrode consists of the ITO as working electrode, a platinum counter electrode, and a saturated Calomel $Hg/Hg_2Cl_2/KCl$ ($\approx 0.248 V$ vs SHE) as the reference electrode. The impedance spectra were recorded in the frequency range from 0.1 Hz to 100 kHz at the formal potential of the $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ redox couple 200 mV. The amplitude of the alternating voltage was 10 mV. The measurements were carried out at room temperature ($22^\circ C$) in a Faraday cage in order to improve the signal-to-noise ratio and repeated three times in order to ensure result reproducibility. The impedance data were represented in the complex impedance plot (Nyquist plot). The data of electrochemical impedance measurements were simulated with an equivalent circuit to understand the role of each electrical component in this circuit. The electric equivalent circuit bare electrode could be interpreted by the Randle's equivalent circuit model in which: R_s , Z_w , R_{ct} , and C_{dl} represent respectively the ohmic resistance, the Warburg impedance resulting from diffusion of ions from bulk electrolyte to the electrode interface, the charge transfer resistance of the redox probe and the double layer capacitance. The two components in the electric equivalent circuit of an electrochemical cell, R_s and Z_w , represent bulk properties of the electrolyte solution and diffusion features of the redox probe in solution. These components are not affected by chemical transformations occurring at the electrode surface. The other two components R_{ct} and C_{dl} , depend on the dielectric and insulating features at the electrode/electrolyte.

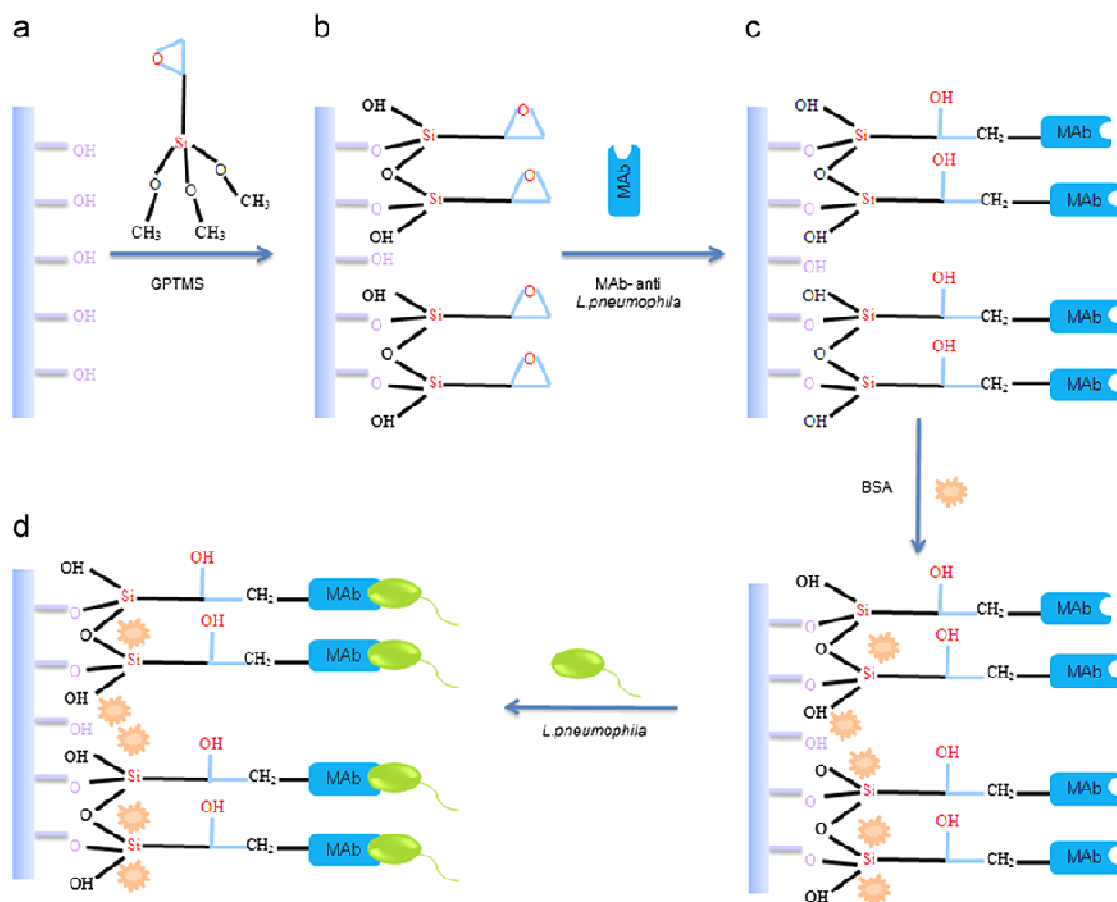


Fig. 1. Schematic illustration of each steps of surface modification: (a) 3-(Glycidoxypyl) trimethoxysilane SAM (2% epoxysilane/CCl₄, v/v), (b) covalent immobilization MAb-anti *L. pneumophila* on modified electrode (20 ml of a 2.36 mg mL⁻¹), (c) BSA chemical blocking agent and (d) specific binding of *Legionella pneumophila*.

2.5. Atomic force microscopy (AFM)

The surface topologies of the modified electrode were imaged using Atomic Force Microscopy (AFM) Nanoscope V dimension 3100 (Digital Instruments) in tapping mode. The Root Mean Square (RMS) was used to characterize the surface in terms of irregularity and height distribution. In our work, AFM roughness profiles were measured on five different zones of the surface and the average value roughness was determined. AFM imaging was made at room temperature in constant force. Deflection and topographic mode images were scanned simultaneously at a fixed scan rate of 1 line/s. All electrodes were washed thoroughly using water and dried with nitrogen before testing in air.

2.6. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Confocal images and analysis were performed at the Center of Confocal Microscopy Multiphotonic of the University of Saint-Etienne (France). We used a TCS-SP2 confocal microscope from Leica Microsystems (Leica, Heidelberg, Germany), attached to an inverted microscope with oil immersion objective (HCX APO L U-V-I 63 Å 1.2NA), and fitted with Acousto-Optical Beam Splitter (AOBS) covering a 350–850 nm wavelength range.

The system was equipped with a set of lasers: argon (458, 476, 488 and 514 nm), helium-neon (573 nm), helium (633 nm) lasers for classical CLSM (confocal laser scanning microscopy). For our purposes, pictures were made using 488 nm argon laser.

2.7. Sessile drop experiment

Contact angle were measured using a GBX-Digidrop Scientific Instrument (Romans, France). The measurements were conducted to investigate the hydrophilic/hydrophobic nature of the electrode surface before and after each step of surface modification by the static sessile drop method. The drop image was stored by a video camera and an image analysis system calculated the contact angle (θ) from the shape of the drop.

3. Results and discussion

3.1. AFM images of the epoxysilane monolayer and antibody

In order to characterize the surface modification and to obtain information on its architecture, AFM measurements were performed. Differences in the topography of the ITO surface can be observed before (data not shown) and after cleaning (see Fig. 2A). The decrease of the RMS value from 17 to 1.3 nm was attributed to the homogeneous and flat surface of the bare electrode and to the effectiveness of the cleaning method. This structure is consistent with the STM nanograph of a bare ITO surface reported by Ng et al. [25]. Fixation of epoxysilane films on ITO electrode (Fig. 2B) was significantly different from the topography obtained on bare ITO electrode after cleaning (see Fig. 2A). This feature indicated that the formation of SAM was accomplished by adsorption from carbon tetrachloride solution with 2% silane on the electrode surface.

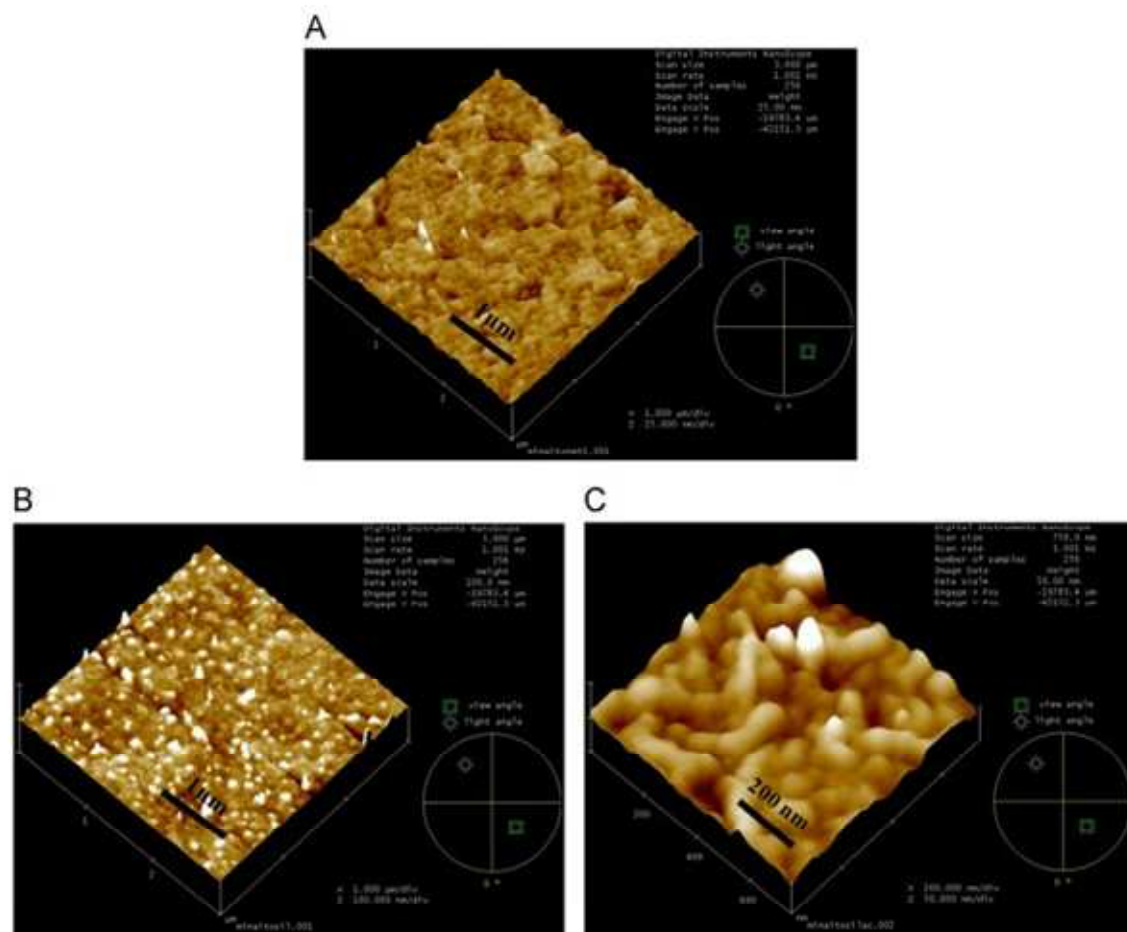


Fig. 2. AFM images of (A) bare ITO electrode after cleaning, (B) GPTMS-modified electrode and (C) MAb anti-*Legionella pneumophila* immobilization.

The monolayer composed was dense, complete, relatively smooth, roughly homogeneous and with only a few aggregates (RMS \approx 3.13 nm). This result is consistent with the report on epoxy-terminated self-assembled monolayers on single crystal silicon and ITO surfaces [10,26]. Other studies have confirmed a non-smoothing GPTMS monolayer surface by the RMS value (RMS \approx 3.5 nm) [27].

The AFM topography image of the SAM after treatment by antibodies exhibited a quite different aspect, consisting in distributed round globular particles that may correspond to the MAb bound onto the epoxysilane layer (see Fig. 2C). The antibody molecules did not assemble as the epoxysilane molecules in a monolayer, because some aggregates can still be observed on the surface and then induce an RMS increase (RMS \approx 6.7 nm). It could be explained by the short length of the alkyl chain of GPTMS.

3.2. CLSM images of the specific binding of *L. pneumophila* sgp 1 cells

In order to verify the *L. pneumophila* attachment on the electrode surface, observation of the sensor surface was performed using a Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM). After the electrode preparation (see paragraph 2.3), suspensions of *L. pneumophila* (5×10^6 CFU mL $^{-1}$) were incubated during 1 h at room temperature in order to evaluate their capability to bind to detection antibodies. The biosensor was then washed using PBS and dried. A CLSM image of *L. pneumophila* cells successfully captured on the sensor surface is shown in Fig. 3.

3.3. Contact angle

A low contact angle of 51.731° (Table 1) initially obtained for the bare ITO-glass plate after cleaning was related to surface super-hydrophilic hydroxyl groups. The contact angle increased from 57.61731° for the GPTMS modified ITO electrode to 65.51731° after the covalent immobilization of the antibodies. This increase could be explained by the presence of hydrophobic alkyl chains of GPTMS molecules that reduce the hydroxyl groups of the bare ITO-glass after the silanization step and hydrophobic nature of antibodies. These results were in accordance with those obtained by Luzinov et al. who show 511° under the same conditions but with a 1% epoxysilane concentration [26].

3.4. Electrochemical impedance spectroscopy of the epoxysilane monolayer and antibody

Fig. 4 shows the impedance response of the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redox probe on the bare ITO electrode (a curve), the SAM modified ITO electrode (b curve) and the antibody dipped electrode (c curve). This increase in the charge transfer resistance (R_{ct} , the diameter of semicircles) was observed following silanization and then antibody binding.

It indicates that the presence of the epoxysilane monolayer formed a barrier that prevented direct approach of the redox species to the electrode surface. This observation is consistent with the result in the literature that the deposition of the SAM of alkylsiloxane on ITO surface led to a large increase in charge-

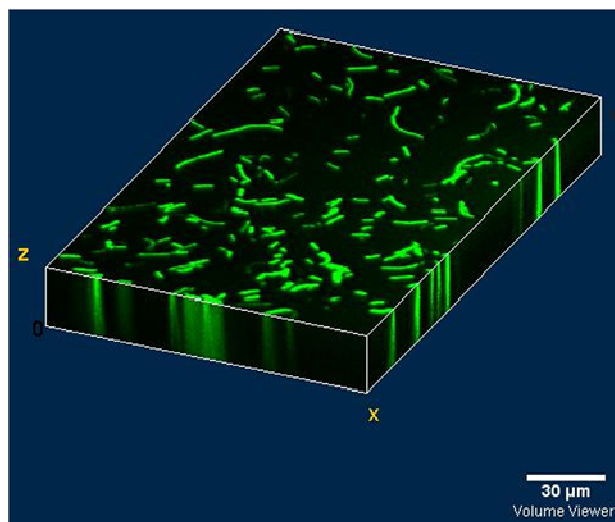


Fig. 3. 3D CLSM images of the ITO-Epoxy-MAb electrode after *Legionella pneumophila* deposition (5×10^6 CFU mL⁻¹).

Table 1
Contact angles of coating samples.

Materials	Contact angle
Bare ITO	65.17°
ITO-Epoxy	58.17°
ITO-Epoxy-MAb	65.17°

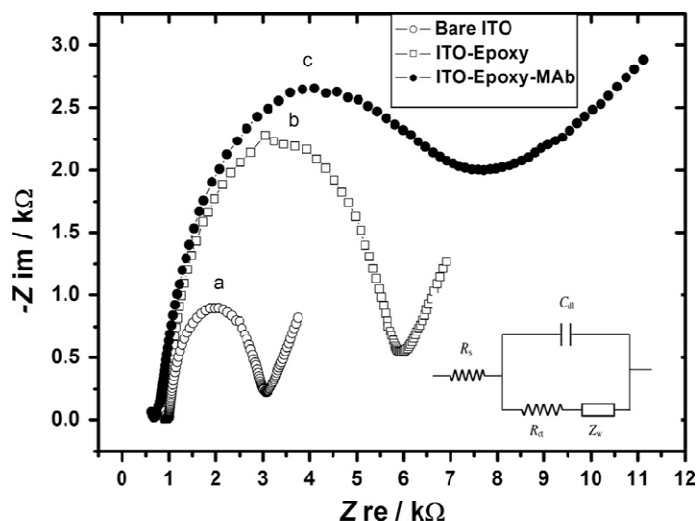


Fig. 4. Nyquist diagrams for impedance measurements corresponding to (a) bare ITO, (b) ITO-Epoxy and (c) ITO-Epoxy-MAb electrode. The inset shows the equivalent circuit.

transfer resistance [28]. This higher charge-transfer resistance value suggests that the resultant monolayer films are compact, highly ordered with very low defects [29].

Similarly, an increase in charge transfer resistance between the monolayer-modified electrode and the antibody-immobilized electrode was observed. This was also the greatest change among all these electrical elements, suggesting that antibody layer created an additional barrier and further prevented the access of the redox probe to the electrode surface. The magnitude of the changes in the charge transfer resistance indicates that the antibody blocked the electron transfer more effectively than the epoxysilane monolayer.

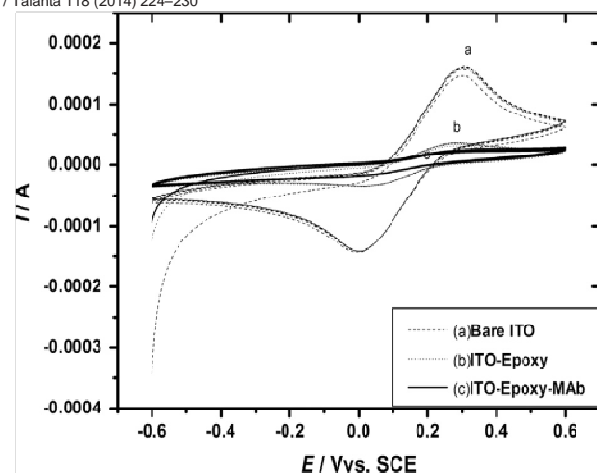


Fig. 5. Cyclic voltammograms of three repetitive scans of (a) bare ITO, (b) ITO-Epoxy and (c) ITO-Epoxy-MAb electrode, in PBS solution (0.16 mol L⁻¹ pH 7.2) containing 3 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-}. The scan rate is 0.1 V s⁻¹.

3.5. Cyclic voltammetry of the epoxysilane monolayer and antibody

Cyclic voltammetry using [Fe(CN)₆]^{3-/4-} as redox couple is a suitable technique to investigate and monitor the various stages of the biosensor construction on ITO electrode [30]. Fig. 5 shows the superimposed cyclic voltammograms of [Fe(CN)₆]^{3-/4-} recorded for bare ITO electrode (a curve), silane (b curve) and antibody modified ITO electrode. It is shown that the epoxysilane monolayer and the antibody act as barriers for the electron transfer between the electrode surface and the redox species in the solution, resulting in most significant decreases in the current. These results corroborate those found by electrochemical impedance spectroscopy.

3.6. Detection of bacteria

The impedimetric biosensor was used for the detection of *L. pneumophila* in spiked samples. Fig. 6A shows the Faradaic impedance spectra, presented as Nyquist plots (-Z_{im} vs Z_{re}) of the anti-*Legionella pneumophila* antibody-modified ITO electrode (a curve) after binding of *L. pneumophila* at different concentrations: without bacteria (a curve), 5 × 10¹ CFU mL⁻¹ (b curve), 5 × 10² CFU mL⁻¹ (c curve), 5 × 10³ CFU mL⁻¹ (d curve), 5 × 10⁴ CFU mL⁻¹ (e curve) and 5 × 10⁵ CFU mL⁻¹ (f curve). The electrode's charge transfer resistance was determined for each bacterial concentration by fitting the measured impedance onto the electrodes using the Randle's equivalent circuit (see inset Fig. 4). The results showed the gradually increase in the R_{ct}, (the diameter of semicircles) due to the bacteria cells bounds and may gave rise to an additional barrier between the ITO electrode surface and the redox species [Fe(CN)₆]^{3-/4-} in the solution leading to an electron transfer blockage. This result is consistent with the findings obtained by Ehret et al. [31]. Fig. 6B shows a linear relationship between the variation of charge transfer resistance ΔR_{ct} and different logarithmic concentrations of *L. pneumophila* in the range of 5 × 10¹–5 × 10⁵ CFU mL⁻¹ with a correlation coefficient of 0.994. The lowest concentration of *L. pneumophila* which could be unambiguously detected during this study was 5 × 10¹ CFU mL⁻¹. This relatively good sensitivity, in comparison to the literature, is likely to be due to the use of an antibody of particular affinity for the targeted bacteria in complex pluri-contaminated environmental samples (water samples) as previously shown by Allegra et al. [21]. This detection threshold is of lower value when compared to those obtained using other immunosensors either using electrochemical impedance spectroscopy detection [14,15,31], surface plasmon resonance detection or optical waveguide light

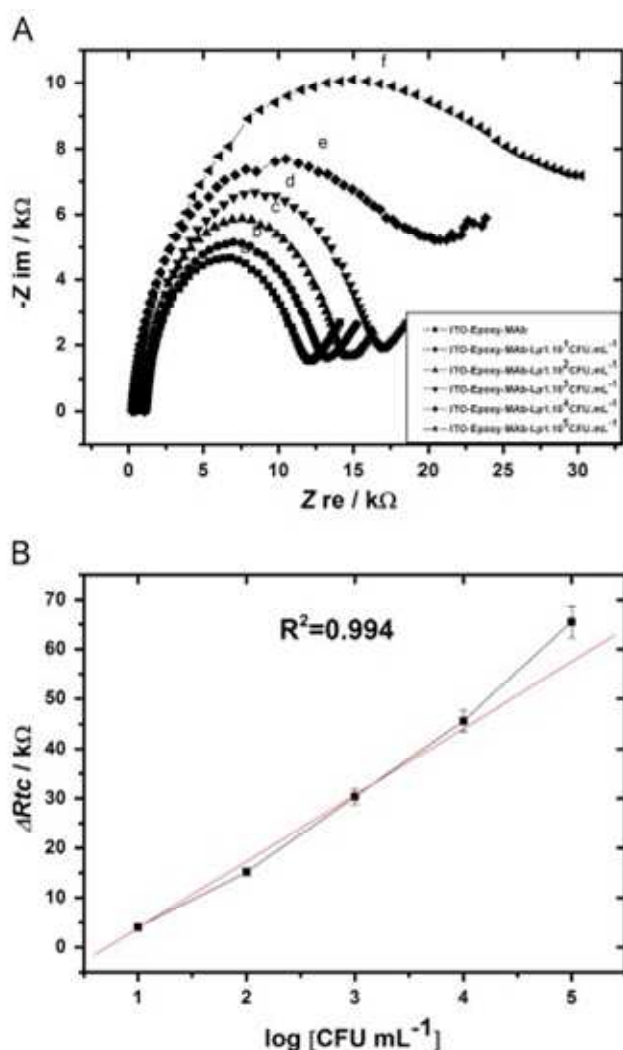


Fig. 6. (A) Impedance Nyquist plot for different *Legionella pneumophila* concentrations in presence of 3 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]³⁻ for (a) ITO-Epoxy-MAb (0 CFU mL⁻¹), (b) 5 Å 10¹, (c) 5 Å 10², (d) 5 Å 10³, (e) 5 Å 10⁴ and (f) 5 Å 10⁵ CFU mL⁻¹; (B) Variation of the fitted ΔR_{ct} with the logarithmic concentration of *Legionella pneumophila*.

mode spectroscopy [19–23]. Quite similar to us is the detection threshold (2 Å 10² CFU mL⁻¹) achieved by Li et al. [14] using an immunochip prepared by covalently immobilizing fluorophore-conjugated *L. pneumophila* antibodies on gold chip.

Recently, Lei and Leung [32] have reported the design of an ITO-based interdigitated microelectrode array for the detection of *L. pneumophila* serogroup 5. Bacterial concentrations in samples could be estimated in a range between 10⁵ and 10⁸ CFU mL⁻¹. But, for low bacterial concentration (<10⁴ CFU mL⁻¹), the authors did not find statistically significant difference in impedance measurements.

None of the non-*Legionella* bacteria that are frequently isolated with *L. pneumophila* in environmental samples could be detected by our antibody. In a previous study, DP-Lp1-O2 MAb was shown to not cross-react with non-*Legionella* bacteria [21]. When various concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* (for instance) together with *L. pneumophila* were tested for their recovery through IMS (immunomagnetic separation) testing, the percentage recovery of *L. pneumophila* by DP-Lp1-O2 was not influenced by the proportion of *P. aeruginosa* [21]. In addition, when testing the capability of the DP-Lp1-O2 MAbs on real highly contaminated environmental samples

(biofilms, sanitary hot water, cooling tower water) using IMS, the percentage recovery of *L. pneumophila* was not influenced by the proportion of interfering bacteria present in the samples [21].

Although specificity of the anti-*Legionella* antibody used in this study was previously reported [21], it was also tested against different bacteria (*P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) at high concentration (10⁵ CFU mL⁻¹). Our results confirmed that no apparent binding between the monoclonal anti-*Legionella pneumophila* antibody immobilized on the functionalized ITO surface and *Pseudomonas* or *Staphylococcus* was observed as no variation of R_{ct} measurement could be measured (data not shown).

4. Conclusion

Our goal was to first characterize the immobilization of an anti-*Legionella pneumophila* antibody on an indium–tin oxide electrode and to evaluate its potential for the detection of *L. pneumophila* in spiked samples. Characterization of the immunosensor using AFM, contact angle measurements, CV and EIS demonstrated its appropriate design. These methods confirmed the functionalized ITO electrode by both epoxysilane and antibodies.

The detection threshold reproducibly achieved in spiked samples was 5 Å 10¹ CFU mL⁻¹. This relatively good sensitivity is likely to be due to the use of the exclusive antibodies selected from the Dresden panel [22,23] which has already proven its strong efficiency when testing the capability of an immunomagnetic separation assay on highly contaminated environmental samples [21]. Quantitative changes in electric parameters demonstrated that the epoxysilane monolayer and the antibody immobilization act as barriers for the electron transfer between the electrode surface and the redox species in the solution, resulting in most significant increases in the charge transfer resistance compared to all other impedance components. When compared to previously described immunosensors aimed at detecting *L. pneumophila* in environmental samples, our assay is easy to use, non-time consuming and does not require labels or specific sample preparation procedure. It benefits from a unique design through the use of a monoclonal antibody which has a particular affinity for the targeted bacteria and, provided that our preliminary results on spiked samples are confirmed in natural water samples, has the potential to be used as an alternative to current detection methods for *L. pneumophila*.

The addition of a recirculation sample device on the immunosensor may also increase its sensitivity. It may also be used to evaluate the risk of exposure to *L. pneumophila* with the potentiality to be used in various types of field applications (following aerosol sampling in a liquid medium for instance). For hot water, the miniaturization of the captor could allow its installation directly within water lines.

Acknowledgments

This project was supported by “Conseil régional Rhône-Alpes”, France through its COOPERA call for proposals (2012) and by « Action Intégrée Franco-Tunisienne du Ministère des Affaires Etrangères et Européennes français et du Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique tunisien » under No. 12G1123–No. Egide 26443UH.

We are grateful to Naoufel Sakly (Laboratoire des Interfaces et Matériaux Avancés, Université de Monastir, Tunisia) for AFM pictures and to Sabine Palle (Laboratoire Hubert Curien, Université Jean Monnet, France) for CLSM pictures.

References

- [1] M. Alary, J.R. Joly, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 2360–2367.
- [2] W.C. Winn, *J. Infect. Dis. Clin. North Am.* 7 (1993) 377–392.
- [3] N. Tijet, P. Tang, M. Romilowich, C. Duncan, V. Ng, D.N. Fisman, F. Jamieson, D.E. Low, *Emerg. Infect. Dis.* 16 (2010) 447–454.
- [4] M.E. Schoen, N.J. Ashbolt, *Water Res.* 45 (2011) 5826–5836.
- [5] S. Allegra, F. Berger, P. Berthelot, F. Grattard, B. Pozzetto, S. Riffard, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 7813–7816.
- [6] S. Allegra, F. Grattard, F. Girardot, S. Riffard, B. Pozzetto, P. Berthelot, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 1268–1275.
- [7] H.A. Keserue, A. Baumgartner, R. Felleisen, T. Egli, *Microb. Biotechnol.* 5 (2012) 753–763.
- [8] C. Féraudet-Tarisse, M.L. Vaisanen-Tunkelrott, K. Moreau, P. Lamourette, C. Creminon, H.J. Volland, *Immunol. Methods* 391 (2013) 281–284.
- [9] W.J. Kim, S. Kim, B.S. Lee, A. Kim, C.S. Ah, C. Huh, G.H. Sung, W.S. Yun, *Langmuir* 25 (2009) 11692–11697.
- [10] L. Yang, Y. Li, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 1407–1416.
- [11] A.N. Asanov, W.W. Wilson, P.B. Oldham, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1156–1163.
- [12] S. Besbes, H. Ben Ouada, J. Davenas, L. Ponsonnet, N. Jaffrezic, P. Alcouffe, *Mat. Sci. Eng.* 26 (2006) 505–510.
- [13] J. Davenas, S. Besbes, A. Abderrahmen, N. Jaffrezic, H. Ben Ouada, *Thin Solid Films* 516 (2008) 1341–1344.
- [14] L. Nan, B. Arujun, J.V. Anthony, P. Akriti, R.C. Xin, W.S.H. Vinci, G. Cyril, T. Mauricio, K. Kagan, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3485–3488.
- [15] V. Rai, J. Deng, C.S. Toh, *Talanta* 98 (2012) 112–117.
- [16] B.K. Oh, Y.K. Kim, W. Lee, Y.M. Bae, W.H. Lee, J.W. Choi, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 605–611.
- [17] H.Y. Lin, Y.C. Tsao, W.H. Tsai, Y.W. Yang, T.R. Yan, B.C. Sheu, *Sens. Actuator. A-Phys.* 138 (2007) 299–305.
- [18] M.B. Young, B.K. Oh, W. Lee, H.L. Won, J.W. Choi, *Mater. Sci. Eng. C* 24 (2004) 61–64.
- [19] I.R. Cooper, S.T. Meikle, G. Standen, G.W. Hanlon, M.J. Santin, *Microbiol. Methods* 78 (2009) 40–44.
- [20] M.S. Cheng, S.H. Lau, V.T. Chow, C.S. Tow., *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 6453–6459.
- [21] S. Allegra, F. Girardot, P. Berthelot, J.H. Helbig, B. Pozzetto, S. Riffard, *J. Appl. Microbiol.* 110 (2011) 952–961.
- [22] J.H. Helbig, J.B. Kurtz, M.C. Pastoris, C. Pelaz, P.C. Lück, *Clin. Microbiol.* 35 (1997) 2841–2845.
- [23] J.H. Helbig, S.A. Uldum, S. Bernander, P.C. Lück, G. Wewalka, B. Abraham, V. Gaia, T.G. Harrison, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 838–840.
- [24] S. Kimura, K. Tateda, Y. Ishii, M. Horikawa, S. Miyairi, N. Gotoh, M. Ishiguro, K. Yamaguchi, *Microbiology* 155 (2009) 1934–1939.
- [25] H.T. Ng, A. Fang, L. Huang, S.F.Y. Li, *Langmuir* 18 (2002) 6324–6329.
- [26] I. Luzinov, D. Julthongpiput, A.L. Vinson, T. Cregger, M.D. Foster, V. Tsukruk, *Langmuir* 16 (2000) 504–516.
- [27] D.H. Dinh, E. Pascal, L. Vellutini, B. Bennetau, D. Rebière, C. Dejous, D. Moynet, C. Belin, J.P. Pillot, *Sens. Actuator. B-Chem.* 146 (2010) 289–296.
- [28] H. Hillebrandt, M. Tanaka, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 4270–4276.
- [29] A. Muthurasu, V. Ganesh, *J. Colloid Interf. Sci.* 374 (2012) 1095–1103.
- [30] M. Souiri, I. Gammoudi, L. Mora, H. Ben Ouada, T. Jouenne, N. Jaffrezic-Renault, C. Dejous, A. Othmane, A.C. Duncan, *J. Environ. Sci. Eng. A* 1 (1998) 924–935.
- [31] R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, K. Stegbauer, B. Wolf, *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 29–34.
- [32] K.F. Lei, P.H.M. Leung, *J. Microelectron. Eng.* 91 (2012) 174–177.



Contactless functional testing of grating-coupled evanescent wave (bio)chemical sensors

David Pietroy^a, Olivier Parriaux^{b,*}, Thibaut Epalle^c, Svetlen Tonchev^{b,1}

^a Laboratoire des Technologies de la Microélectronique, 17 rue des Martyrs, 38000 Grenoble, France

^b Laboratoire Hubert Curien UMR CNRS 5516, 18 rue Benoit Lauras, Université de Lyon, 42000 Saint-Etienne, France ^c

GIMAP Group on Mucosal Immunity and Pathogenic Agents, Université de Lyon, 42000 Saint-Etienne, France

article info

Article history:

Received 24 February 2011

Received in revised form 17 May 2011

Accepted 1 June 2011

Available online 17 June 2011

Keywords:

Waveguide gratings

Resonant reflection

Evanescent wave sensors

Biosensors

Wafer-level testing

abstract

The contactless measurement of the sole modulus of the reflection coefficient of a grating-coupled slab waveguide sensor at three definite points of the reflection spectrum gives all necessary information for the determination of the complete set of phenomenological parameters of a waveguide grating (bio)chemical sensor thanks to a physically meaningful representation of the resonant reflection of a free space wave in the form of a circle in complex plane. This property leads to a simple, non-destructive, wafer-scale functional testing methodology of grating-coupled (bio)chemical sensor chips.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Most optical biochemical sensors of the non-plasmonic type use a high refractive index waveguide layer and a grating to somehow couple an incident beam to a guided mode of the slab waveguide [1] at the surface of which the biological reaction takes place. The first demonstration of such a structure as a sensor was made about thirty years ago [2]. Since then, a number of different embodiments of the basically same principle of resonant-grating-mediated evanescent wave sensing have been reported and some are now offered on the market [3–7]. Once a batch-producible optical element such as a biochip reaches its industrial stage of mass fabrication one important step of the manufacturing process is the wafer-level testing of each element. This is what takes place systematically in micro-electronics [8]. Now as the technology of multilevel DOE Diffractive Optical Elements has become a mature technology, the same concern emerges [28] with possibly, like in microelectronics, specific test structures placed on the wafer next to the functional elements for PCM Process Control Monitoring. This is also a concern with the fabrication of more complex functional elements like semiconductor laser chips for instance [9] where the testing and sorting

out of the elements must be made wafer scale before the expensive operations of singulation and packaging are undertaken. Apart from identifying faulty elements, wafer-scale testing also permits to trace back possible drifts in the fabrication processes. In the manufacturing of biosensor chips the fabrication scheme comprises only a few process steps which do not have a high degree of complexity: a photolithography or nanoimprint of the grating pattern, followed by the dry etching of the wafer substrate (usually glass or fused quartz), and finally by the deposition of a high index waveguide layer. Despite its simplicity, such a structure is characterised by a quite large number of optogeometrical parameters which are the grating period (which can be considered as exactly known), the corrugation depth, line/space ratio and angle of the groove walls, refractive index with possible birefringence and thickness of the waveguide layer. These are no less than 5 opto-geometrical parameters without considering the incidence conditions. There are two types of difficulties in the testing of such structures. On the one hand, these parameters are difficult to measure: SEM and AFM are destructive and non-contactless, respectively, much too time consuming and, most importantly, they are local tests which tell nothing on the long range characteristics of the elements that play an important role in their optical function. A separate testing of the substrate corrugation and of the waveguide layer thickness and index would be possible by using scatterometry [10] and ellipsometry [11], respectively; however this would not remove the second difficulty which lies in the fact that, unlike in all usual diffractive optical elements, grating-coupled waveguiding layers are resonant

* Corresponding author.

¹ E-mail address: parriaux@univ-st-etienne.fr (O. Parriaux).

On leave from the ISSP of the Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria.

diffractive elements where the opto-geometrical parameters affect the optical function in an intricate, non-separable fashion. To have access to the actual optical function which a resonant grating performs, a phenomenological model must be defined which links the set of all opto-geometrical parameters to a restricted set of phenomenological parameters. Such a phenomenological coupled wave model exists. The phenomenological parameters describing the mode coupling mechanism are the mode propagation constant γ , the radiation coefficient of the grating waveguide mode, and the coupling coefficient a_p expressing the coupling between the incident wave and the guided mode. This model was created and developed in the early days of integrated optics [12–14] but was essentially overlooked during the development of the optical biosensor domain. Most papers only make use of the Ewald diagram [15] and the slab waveguide dispersion equation [16] to set the phase matching conditions between wave vectors and the grating spatial frequency. Besides, a simple numerical analysis, most often based on the RCWA Rigorous Coupled Wave Analysis [17], is made to calculate the diffraction efficiency of the involved orders which brings limited physical insight. A notable exception in this respect is the early biosensor patent of Stewart [18], where the physics of waveguide resonance is used to give rise to an astute sensor design exploiting a unique properties of mode resonance under frustrated total internal reflection excitation. The same physical approach can be used with grating excitation on the basis of the work of Sychugov et al. [19].

We have shown in Pietroy et al. [20] that a link can be established between the three coupled-wave phenomenological parameters γ , γ , a_p , and the modulus and phase of the reflection coefficient of an incident wave on a resonant grating by means of a vivid circle representation of the reflection spectrum in the complex plane. We have also shown that the use of an ellipsometer plus some hardware add-on does permit to retrieve the set of three phenomenological parameters, therefore to fully characterize the functional operation of a resonant grating. The example given was that of a biosensor chip [21]. We show in the present paper that the phenomenological model can actually be fully retrieved by the sole measurement of the modulus of the reflection coefficient at three definite points of the reflection spectrum. This is, we think, a breakthrough that can be the basis for a full wafer-level testing of batch-manufactured resonant grating (bio)chemical sensors by means of a very simple instrumentation.

There is more that can be said about the three phenomenological parameters γ , γ , a_p . Not only do they advantageously replace the set of at least five opto-geometrical parameters of the structure with a definite wave coupling functional meaning, but they are also very relevant to a (bio)chemical sensor application and give direct information on key sensor characteristics: the sensitivity is inversely proportional to the radiation coefficient γ [22], and γ determines the operation point of the sensor (the resonance incidence angle or wavelength).

The usefulness of the presented testing method is mainly in the monitoring of a manufacturing process of which it assesses the uniformity wafer-scale and the stability from run to run, allowing to detect possible drifts in the technological parameters. It can also be useful in a development and prototyping phase where the design of a specific sensor must be optimised: as the functional design of a sensor is essentially made on the basis of specifications on the sensitivity, spatial resolution and resonance position, the testing method described here can be used as a characterization tool giving direct access to the specified parameters.

The application domain which the paper refers to is that of biosensing. This is however not limitative: any optical element involving resonant reflection from a slab grating waveguide can be characterized and tested by means of the described method.

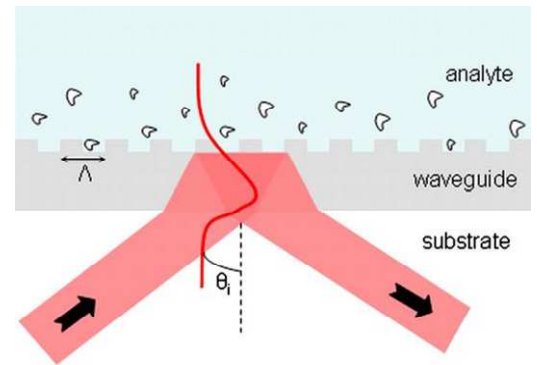


Fig. 1. Excitation scheme of a guided mode in a waveguide grating biosensor.

2. The circle representation of the reflection from a resonant grating

Fig. 1 illustrates the typical incidence configuration on a grating-coupled waveguide with a bioreaction taking place at its surface. The synchronous resonant mode excitation is obtained by adjusting the incidence angle θ_i or by tuning the wavelength λ . Such a structure is said resonant gratings of 0th order where the periodic surface corrugation is associated with a slab waveguide layer of which the grating of period Λ can excite a guided mode via one of its diffraction orders, preferably its + or -1st order. The typical angular or wavelength reflection spectrum of such a planar structure exhibits a base line which is essentially the Fresnel reflection of the (multi)layer and, in the mode coupling resonance neighborhood, a minimum and a maximum. This maximum can theoretically reach 100% as first analysed by Sychugov and team in 1985 [19] and rigorously demonstrated by Popov and Maystre in 1986 [23]. Such a reflection effect is of resonant nature which makes it wave-length, polarization and angularly selective. Although the aim of the present paper is to permit the testing of the optical function of grating-coupled biosensors, its scope extends to all 0th order resonant gratings such as those used as in the form of an undulated high index film embedded in a polymer matrix to be used in secured traceability and authentication [24].

The link between the phenomenological parameters γ , γ , a_p and the features of the reflection spectrum was established in [20]. The present paper further condenses and simplifies the complex experimental retrieval procedure established in [21] which can now be implemented in form of a dedicated testing method.

One first defines the scanning parameter. It is a condensed spatial frequency parameter k :

$$k = \frac{2 \sin \theta_i}{\lambda} - \frac{2}{\Lambda} \tag{1}$$

where θ_i is the incidence angle of a free-space wave on the structure, λ its wavelength and Λ the grating period. This is an in-plane spatial frequency term equal to the projection of the incident wave vector minus the k -vector of the grating in a collinear coupling configuration. The theoretical study led in [20] showed that the 0th order reflection coefficient r of a plane wave of spatial frequency k exciting a mode of a grating waveguide can be expressed in the neighborhood of the synchronism condition as the sum of a constant off-resonance reflection term r_0 , and a polar function accounting for mode excitation and containing all three phenomenological parameters:

$$r(k) = r_0 + \frac{a_p}{(k - \gamma) - i} \tag{2}$$

The modulus of the complex quantity $(a_p / (k - \gamma) - i) - i(a_p / 2)$ can be shown to remain constant for any value of the scanning

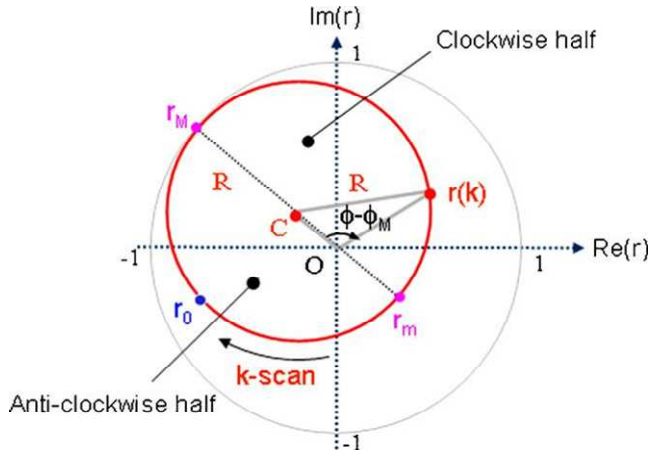


Fig. 2. Circle representation of the reflection coefficient $r(k)$ of a resonant grating in the complex plane in the neighborhood of the resonance with identification of the (anti)clockwise halves of the circle relative to r_M .

parameter k . Thus, the second term of (2) is represented in the complex plane by a circle of radius $R = |a_p|/2$, centered at the complex point $z_0 = i|a_p|/2$, and passing through the origin. Noting that the resonance effect is in most cases very localized, the off-resonance reflection r_0 can be considered as constant along the scanning range and the representation of the reflection coefficient $r(k)$ is the same circle translated by the complex constant r_0 and theoretically reaching a maximal modulus of 1 at the resonant reflection point r_M as known from [19]. This circle is centered at point C:

$$C = \frac{r_0 + ia_p}{2} \tag{3}$$

as sketched in Fig. 2. The resonant reflection r_M and the off-resonance reflection r_0 are diametrically opposed to the reflection minimum r_m

and to the reflection coefficient r at synchronism ($k = \lambda$), respectively.

Upon a continuous increase of the scanning spatial frequency parameter k across the resonance, the running point $r(k)$ describes one complete and single turn clockwise on the circle. Thus, if the off-resonance reflection r_0 is on the anticlockwise-half of this circle relatively to the resonant reflection point r_M ($-\phi_M < \phi_0 < -\phi_M + \pi$, see Fig. 2), the maximum r_M is the first extremum encountered along the scan, $-\phi_M$ and ϕ_0 being the phases of resonant and off-resonance reflections, respectively. If r_0 is on the clockwise-half of the circle relatively to the resonant reflection point r_M ($-\phi_M - \pi < \phi_0 < -\phi_M$), the first extremum encountered is the minimum r_m . What affects the reflection modulus also affects the phase of the reflection coefficient. The shape of the phase spectrum upon the scan of k in the neighborhood of resonance depends strongly on the relative position of the resonance circle and of the origin O of the complex plane. If the origin is contained in the circle, which is the case in the situation represented in Fig. 2, the phase changes by 2π upon a scan through the resonance whereas it experiences a limited oscillation of less than π if the origin is outside the circle.

3. The retrieval of the phase function of a grating waveguide

In Pietroy et al. [21] we showed that the complete characterization of a waveguide grating, i.e., the retrieval of its three phenomenological parameters $\lambda_r, \lambda_s, a_p$ can be performed by means of an ellipsometer with a hardware add-on. But such a setup is not commonly available, the needed accessory is all but simple, and use of a basic optical instrumentation would be preferable; the difficulty which the previously proposed experiment tried to overcome

is that of measuring the complex phase of a reflection coefficient. This is known to be a very difficult experimental problem. We show in the present paper that a full exploitation of the physical content of the complex circle representation actually permits to bypass this difficult phase measurement.

The first thing to clear up in a given biosensor chip is to determine whether the center of the complex plane is contained in the circle representing the reflection coefficient in the neighborhood of the resonance. This can be achieved using the simple polarimetric arrangement explained in Section 3.2 of Pietroy et al. [20].

Let us then consider the OCr(k) triangle in Fig. 2. Whatever the position of the running point $r(k)$ on the circle, this triangle is defined by constant distances $OC = r_M - R = (|r_M| \pm |r_m|)/2$ and $Cr = R = (|r_M| \mp |r_m|)/2$, the upper and bottom signs corresponding to the origin of the complex plane located outside and inside the resonance circle, respectively. Noting ϕ_M and ϕ the phase of the reflection coefficient at its modulus maximum r_M and its phase at any k value, respectively, the amplitude $|r(k)|$ of the reflection coefficient and its relative phase $\phi - \phi_M$ are related by the generalized Pythagoras theorem:

$$\cos[\phi(k) - \phi_M] = \frac{[Cr]^2 - [OC]^2 - r(k)^2}{2 r(k) [OC]} \tag{4}$$

$$= \frac{r(k)^2 - \frac{|r_M| - |r_m|}{2} r(k)}{\frac{|r_M| + |r_m|}{2} r(k)}$$

This last expression implies that the sole measurement of amplitudes is required to obtain the phase response of the resonant element.

A last problem is still to be solved: that of the unwrapping of the phase function since the value of the arccosine function value is comprised between 0 and π . This is where the knowledge of the position of the origin of the complex plane relatively to the circle as determined above will be decisive. The maximum r_M and the minimum r_m being diametrically opposed on the circle, the relative phase $\phi_M - \phi_m$ is 0 (leading to a radius $R = (|r_M| - |r_m|)/2$) if the origin is outside and π (leading to a radius $R = (|r_M| + |r_m|)/2$) if it is inside the circle. Then, a second decisive information to correctly unwrap the phase function is the clockwise rotation of the running point on the circle upon an increase of k as stated in [20]. This permits to determine whether the scan starting point corresponding to the off-resonance reflection r_0 is on the clockwise or anticlockwise half of the circle relatively to the maximum reflection point r_M . This is easily determined by identifying the first amplitude extremum encountered along the scan. As the running point turns clockwise, if the first encountered extremum is the maximum r_M , then the off-resonance r_0 is in the anticlockwise-half of the resonance circle and $\phi_0 > \phi_M$; if the minimum r_m is the first encountered extremum, then r_0 is in the clockwise-half circle and $\phi_0 < \phi_M$. These information permit to determine in which quadrant of the complex plane the running point $r(k)$ is located and thus to correctly unwrap the arccosine function to retrieve the absolute phase function $\phi - \phi_M$ of the resonant structure.

The evidence of this property will first be shown here using the ellipsometric measurements of the biosensor reported in Pietroy et al. [21] where all information concerning the structure are given. The aim is here to compare the ellipsometric measurements of the phase (Fig. 3 of the given reference) with the phase retrieval presented above using amplitude measurements and the generalized Pythagoras theorem (expression (4) above). To achieve this phase retrieval, one must first locate the origin of the complex plane relative to the circle. This can be done using Fig. 4 of the same reference which shows that the origin of the complex plane is outside the circle of the considered sensor. Then, applying the present methodology gives the phase

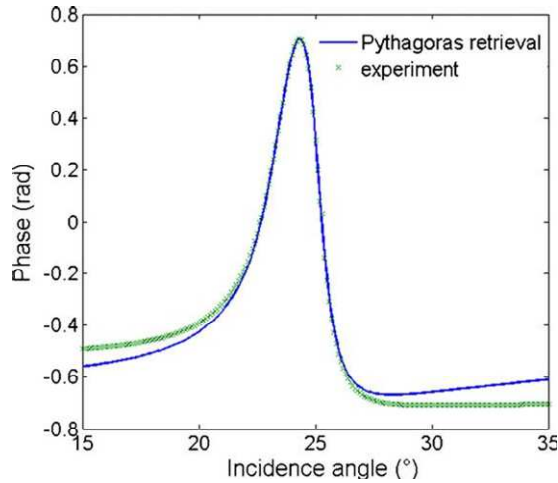


Fig. 3. Retrieval of the phase (solid line) of a resonant grating using the generalized Pythagoras theorem and the amplitude response, and comparison with experimental data (crosses).

present paper. These results fit well with the ellipsometric measurements represented by the crosses which validates the present approach. The slight discrepancy at the edges of the curves is due to the assumption that the off-resonance reflection coefficient r_0 is constant within the scan range which is not strictly true.

4. Complete testing of a grating-coupled sensor

Having validated this new and much simpler phase retrieval method on a known virtual example, we will apply it here to an unknown biosensor structure for which a complete retrieval of the phenomenological parameters will be made. This biosensor has been designed to excite fluorescent biological species immobilized at a waveguide surface at 488 nm wavelength. To that end, and to limit the number of propagating diffraction orders in the analyte, the coupling scheme is that of contradirectional coupling to the fundamental TE mode by means of the -1 st order of the grating. The grating of period $\Lambda = 260$ nm was made by exposing a photoresist film to an interferogram at 442 nm wavelength. The resist grating was then transferred to the fused quartz substrate by Reactive Ion Beam Etching at a depth of about 40 nm. Finally, a metal oxide waveguide layer of 40 nm thickness and 2.12 refractive index was deposited on the silica corrugation. The analyte side of the waveguide layer is also corrugated. The reason for this double sided corrugation is to render the effective index of the TE₀ mode independent of the possible variations of the corrugation depth and duty cycle. This is an elementary measure to make sure that the synchronism mode coupling condition is achieved close to identically everywhere on the wafer. The simple preliminary polarimetric measurement described in Section 3.2 of Pietroy et al. [20] was performed and showed that the origin of the complex plane is outside the resonance circle of this structure. This implies that this circle is contained in only one half of the complex plane and that $\varphi_M = \varphi_m$: the reflection phase spectrum across resonance is a simple oscillation around $\varphi_0 = \arg[r_0]$. Then the biosensor is characterized using an argon laser ($\lambda = 488$ nm) by varying the incidence angle to scan the condensed spatial frequency parameter k defined in expression (1). The incidence is from the air. The modulus of the reflection coefficient is determined by measuring the incident power I_0 and the reflected power I_R , then calculating the ratio $P_R = |r|^2 = I_R/I_0$. The maximum of reflection is found to be $|r_M| = 0.99$ and occurs for an incidence angle of 21.0° in the air which corresponds to a condensed spatial frequency $k_M = -19.55 \text{ m}^{-1}$ accordingly to (1). The reflection minimum is found to be $|r_m| = 0.31$ and occurs at

an incidence angle of 19.25° which corresponds to a spatial frequency $k_m = -19.92 \text{ m}^{-1}$. The off-resonance reflection $|r_0|$ is taken as the mean of the two values measured before and after resonance: $|r_0| = 0.47$. The fact that these two values are slightly different is not a surprise: r_0 is not strictly constant as it contains interfering reflection products from at least the two waveguide interfaces.

It is now possible to calculate the three phenomenological parameters of this grating-mediated modal resonance. The radiation coefficient is calculated using expression (21) of Pietroy et al. [20]: $\alpha = 0.131 \text{ m}^{-1}$. The propagation constant γ is calculated using expression (23): $\gamma = -19.60 \text{ m}^{-1}$. The coupling coefficient a_p is calculated by combining expressions (14) and (17): $a_p =$

$-2r_0]$, and it is where the main problem lies since an absolute optical phase measurement is very difficult to make. Let us consider φ_M as the origin of the phase. We showed that the origin of the complex plane is outside the resonance circle which implies that $\varphi_m = \varphi_M$. Thus a_p , referenced in phase with respect to φ_M , can be expressed as:

$$a_p = -i \cdot [|r_M| + |r_m| - 2|r_0| \exp(i(\varphi_0 - \varphi_M))] \quad (5)$$

Moreover, the minimum reflection modulus is the first extremum encountered upon a scan of the spatial frequency. As the running point $r(k)$ rotates clockwise upon the scan of increasing k , it can be deduced that r_0 is in the clockwise-half of the resonance circle relatively to the maximum reflection point r_M which implies that the relative phase difference $\varphi_0 - \varphi_M < 0$. Therefore, this relative phase can be calculated for $r(k) = r_0$ taking the negative angle whose absolute value is given by the generalized Pythagoras theorem expressed in (4): $\varphi_0 - \varphi_M = -0.534$ rad. So a_p can now be calculated using (5) above: $a_p = 0.087 \exp(-0.787i) \text{ m}^{-1}$. All the phenomenological parameters being experimentally retrieved, it is now possible to reconstruct the functional dependence of the complex reflection coefficient $r(k)$ of the waveguide grating sensor using expression (2) against the precisely measured reflection modulus. The results are presented in Fig. 4 which gives the angular spectrum of the measured and retrieved power reflection coefficient P_R defined as $P_R = |r|^2$.

Actually, many more than the sole three necessary points of the reflection coefficient were measured to compare experimental and retrieved values: the retrieval methodology fits well with the experiment in general. The reconstructed phase function is also given in Fig. 5 and confirms that the phase function looks like a simple oscillation around the phase of the off-reflection resonance φ_0 , meaning that the origin of the complex plane is outside the resonance circle.

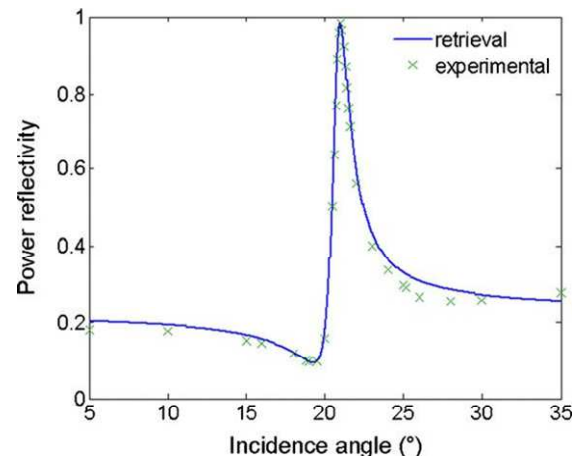


Fig. 4. Comparison between the retrieved (solid line) and the measured (crosses) power reflection coefficient versus the incidence angle

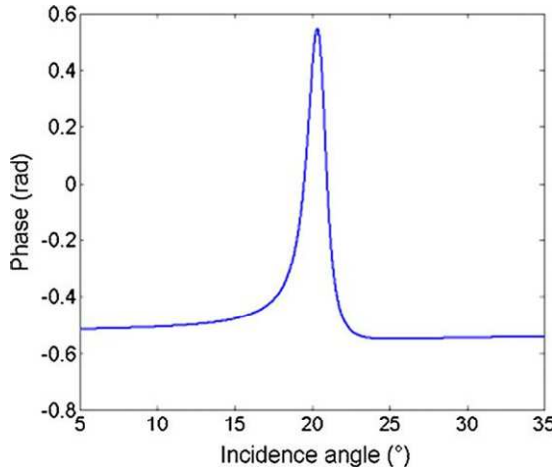


Fig. 5. Retrieved phase of the tested biosensor.

5. Procedure of the complete testing of a grating-coupled sensor

In the last section, we aimed at showing that the complete experimental retrieval of the phenomenological parameters describing a resonance in a grating waveguide structure is possible by using a simple setup (a monochromatic source, a rotation stage and a powermeter) and by measuring three definite points only in the spectrum of the reflection modulus without caring about their phase. In Pietroy et al. [21] this goal was achieved by resorting to a non-standard ellipsometer add-on and a quite delicate experimental measurement of the complex reflection coefficient at an interface. In this section, we propose a summary of this methodology to be used in the form of a procedural sheet of sensor characterization. The modulus of the reflection coefficient $|r(k)|$ is calculated by taking the square root of the measured power reflectivity P_R . All the needed expressions are reminded hereunder for sake of completeness.

Five steps have to be completed for the full testing of a grating-coupled sensor:

1. Measurement of the off-resonance reflection modulus $|r_0|$,
2. Measurement of the maximum (resonant) and the minimum reflection modulus $|r_M|$ and $|r_m|$, and of their locations k_M and k_m in the k -spectrum,
3. Determination of the location of the origin of the complex plane relatively to the resonance circle using the simple polarimetric measurement described in Section 3.2 of Pietroy et al. [20] and summarized hereunder.

Once the resonant and minimum power reflection coefficients $R_M = |r_M|^2$ and $R_m = |r_m|^2$ have been determined (second step above), the power reflection coefficient $R_p = |r_p|^2$ is measured for the orthogonal polarization. The incident beam is then linearly polarized at 45° from the incidence plane and a cross-polarizer analyzes the interference product $r(k)r_p \cos(\alpha - \beta)$ between the two polarizations. This interference product is constructive or destructive depending on the phase difference $\alpha - \beta$ between the two reflection coefficients of both polarizations. In the case of constructive interferences ($\cos(\alpha - \beta) > 0$), the power measured after the output polarizer is larger than the average reflected power $(R(k) + R_p)/2$ (the interference product being destructive if the measured power is lower). The sign of the interference product is then determined for both resonant and minimum reflections r_M and r_m . If the interference products have the same sign for the two resonant and minimum excitation conditions $k = k_M$ and $k = k_m$, then $\alpha_m = \alpha_M$ implying that the origin of the

complex plane O is outside the resonant circle. If the interference products are of opposite sign, then $\alpha_m = \alpha_M + \pi$ and the origin is inside the resonant circle.

A particular case can occur if the phase difference $\alpha_m - \alpha_p$ is close to $\pm \pi/2$, meaning that the interference product is close to zero. In this particular case, the power measured after the output polarizer stays close to the average power reflection coefficient $(R(k) + R_p)/2$ giving no information on the position of the origin relative to the resonant circle. A solution to this is to insert a $\pi/4$ waveplate between the input polarizer and the grating coupled sensor so that the total phase difference $\alpha_m - \alpha_p$ is close to 0 or π .

4. Determination of the relative phase $\alpha_0 - \alpha_M$ using the expressions below. This relative phase is negative if the minimum of reflection is the first extremum encountered upon an increase of the condensation spatial frequency k (increase of the incidence angle or decrease of the wavelength),

$$\cos[\alpha(k) - \alpha_M] = - \frac{r(k) - \alpha \pm |r_M| |r_m|}{(|r_M| - |r_m|) \cos(\alpha_M - \alpha_m)}$$

5. The radiation coefficient ϵ , the propagation constant γ and the coupling coefficient a_p are calculated using the expressions below

$$\epsilon = \frac{k_M - k_m}{2(\epsilon^2 + 1)}$$

$$\gamma = \frac{(k_M + k_m)^2 + (k_M - k_m)^2}{2(\epsilon^2 + 1)} - 1$$

$$a_p = -i[|r_M| \pm |r_m| - 2|r_0| \exp(i(\alpha_0 - \alpha_M))]$$

where $\alpha = (|r_M|^2 - |r_0|^2) / (|r_0|^2 - |r_m|^2)$

The whole reflection response of the sensor can then be computed by inserting these experimentally retrieved parameters into expression (2).

6. Conclusion

The present paper brings to completion the functional analysis of resonant gratings permitting to find out the concise set of phenomenological parameters describing the waveguide coupling mechanism from the sole measurement of the modulus of the reflection coefficient at three specific points of the reflection spectrum (off-resonance, minimum and resonant reflection) in the resonant neighborhood. The analysis method is shown to be applicable to the wafer-level testing of grating-coupled evanescent wave biosensors. Retrieving everywhere needed the waveguide propagation constant, the modal radiation coefficient and the coupling coefficient which fully characterize the grating mode coupling phenomenon. Furthermore, the retrieval of the radiation coefficient ϵ and of the propagation constant γ gives direct access to the biosensor characteristics sensitivity and operation point.

Beyond the application field of biosensors, where the proposed wafer-level testing is particularly useful, the described method can be used to characterize or test any optical device or microsystem based on resonant reflection. In particular, the method is applicable to a wide kind of chemical sensing, for instance in the investigation of the assembly of chemicals [25], to the detection of biomolecules [26] and to the analysis of materials [27].

The model is not valid under normal incidence where the phenomenological parameters themselves exhibit a strong dependence on the scanning parameter k , and where the intra-guide second order coupling coefficient should also be considered.

An interesting outcome which deserves further exploration of the present theoretical development is that it gives an experimental

access to the phase and amplitude of the third phenomenological parameter a_p , called the coupling coefficient, which is difficult to calculate, and even difficult to express from the guided mode field, the incident wave field, and the dielectric corrugation. In this regard, this result represents a valuable complement to the coupled wave phenomenology.

Acknowledgements

This work is a contribution to the work package No. 2 on waveguide measurement in the European Network of Excellence NEMO on microoptics now transformed into the ACTMOST euro-project. The experimental example of biosensor waveguide grating platform was fabricated in the frame of the internal project “biocapteur” of Jean Monnet University headed by the GIMAP Laboratory.

References

- [1] K. Schmitt, K. Oehse, G. Sulz, C. Hoffmann, Evanescent field sensors based on tantalum pentoxide waveguides – a review, *Sensors* 8 (2008) 711–738.
- [2] W. Lukosz, K. Tiefenthaler, Directional switching in planar waveguides effected by adsorption–desorption processes, *IEEE Conf. Publ.* 227 (1983) 152–155.
- [3] K. Cottier, M. Wiki, G. Voirin, H. Gao, R.E. Kunz, Label-free highly sensitive detection of (small) molecules with wavelength interrogation of integrated optical chips, *Sens. Actuators B* 91 (2003) 241–251.
- [4] B.T. Cunningham, P. Li, B. Lin, J. Pepper, Colorimetric resonant reflection as a direct biochemical assay technique, *Sens. Actuators B Chem.* 81 (2–3) (2002) 316–328.
- [5] Y. Fang, A.M. Ferrie, N.H. Fontaine, J. Mauro, J. Balakrishnan, Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing, *Biophys. J.* 91 (5) (2006) 1925–1940.
- [6] N.M. Lyndin, V.A. Sychugov, A.V. Tishchenko, O. Parriaux, N. Athanassopoulou, P. Edwards, C. Maule, J. Molloy, Enhanced visibility grating waveguide biosensor, in: *Proceedings of 5th European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors EUROPT[®] ODE V*, vol. 63, Elsevier, Lyon, France, ed., 2000.
- [7] M. Pawlak, E. Schick, M.A. Bopp, M.J. Schneider, P. Oroszlan, M. Ehrat, Zeptosens’ protein microarrays: a novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis, *Proteomics* 2 (2002) 383–393.
- [8] N. Blayo, R.A. Cirelli, F.P. Klemens, J.T.C. Lee, Ultraviolet–visible ellipsometry for process control during the etching of submicrometer features, *J. Opt. Soc. Am. A* 12 (1995) 591–599.
- [9] G.E. Carver, R.W. Heebner, G. Astfalk, Wafer level testing for semiconductor laser manufacture via spatially resolved photoluminescence, *IEEE J. Selected Topics in Quant. Electron.* 1 (1995) 980–986.
- [10] M. El Kodadi, S. Soulan, M. Besacier, P. Schiavone, Resist trimming etch process control using dynamic scatterometry, *Microelectron. Eng.* 86 (2009) 1040–1042.
- [11] P. Boher, O. Thomas, J.P. Piel, J.L. Stehle, A new multiple wavelength ellipsometric imager: design, limitations and applications, *Thin Solid Films* 455–456 (2004) 809–818.
- [12] M. Nevière, The homogeneous problem, in: R. Petit (Ed.), *Electromagnetic Theory of Gratings*, Springer Verlag, Berlin, 1980, pp. 123–157.
- [13] S.T. Peng, T. Tamir, H.L. Bertoni, Theory of periodic dielectric waveguides, *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.* MTT-23 (1975) 123–133.
- [14] V.A. Sychugov, A.V. Tishchenko, Ray optics philosophy in the problem of corrugated-waveguide excitation with an external lightbeam, *Photon. Optoelectron.* 1 (1993) 79–89.
- [15] G.L. Roger, A simple method of calculating moiré patterns, *Proc. Phys. Soc.* 73 (1959) 142–144.
- [16] P.K. Tien, R. Ulrich, Theory of prism-film coupler and thin-film light guides, *J. Opt. Soc. Am.* 60 (1979) 1325–1337.
- [17] R.W. Day, S.S. Wang, R. Magnusson, Filter-response line shapes of resonant waveguide gratings, *J. Lightwave Technol.* 14 (1996) 1815–1824.
- [18] Stewart, W.J., 1986. Optic-waveguide biosensor. Patent GB 2174802A also EP 0205236(A2).
- [19] G.A. Golubenko, A.S. Svakhin, V.A. Sychugov, A.V. Tishchenko, Total reflection of light from a corrugated surface of a dielectric waveguide, *Sov. J. Quant. Electron.* 15 (1985) 886–887.
- [20] D. Pietroy, A.V. Tishchenko, M. Flury, O. Parriaux, Bridging pole and coupled wave formalisms for grating waveguide resonance analysis and design synthesis, *Opt. Express* 15 (2007) 9831–9842.
- [21] D. Pietroy, O. Parriaux, J.L. Stehle, Ellipsometric retrieval of the phenomenological parameters of a waveguide grating, *Opt. Express* 17 (2009) 18219–18228.
- [22] V.A. Sychugov, A.V. Tishchenko, N.M. Lyndin, O. Parriaux, Waveguide coupling gratings for high-sensitivity biochemical sensors, *Sens. Actuators B* 38–39 (1997) 360–364.
- [23] E. Popov, L. Mashev, D. Maystre, Theoretical study of the anomalies of coated dielectric gratings, *Opt. Acta* 33 (1986) 607–619.
- [24] S.S. Wang, R. Magnusson, Multilayer waveguide-grating filters, *Appl. Opt.* 34 (1995) 2414–2420.
- [25] E. Constable, P. Harverson, J.J. Ramsden, Adsorption of ruthenadendrimers to silica–titania surfaces studied by optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1997) 1683–1684.
- [26] M.G. Cacace, J.J. Ramsden, In-situ monitoring of adsorbed enzyme activity, *J. Biol. Phys. Chem.* 7 (2007) 65–68.
- [27] I. Cooper, S. Meikle, G. Standen, G. Hanlon, M. ans Santin, The rapid and specific real-time detection of legionella pneumophila in water samples using optical waveguide lightmode spectroscopy, *J. Microbiol. Methods* 78 (2009) 40–44.
- [28] D.C. O’Shea, T.J. Suleski, A.D. Kathman, D.W. Prather, Diffractive optics: design, fabrication and test, in: *Testing Diffractive Optical Elements*, SPIE’s Digital Library, 2003, Chapter 9.

Biographies

David Pietroy obtained his Ph.D. in Optics in 2007 at the University of Saint-Etienne (France). During five years, he led studies in the field of waveguide grating structures under the incidence of ultrashort laser pulses at the Hubert Curien Laboratory (France). He is now in a post-doctoral fellowship at the Microelectronic Technologies Laboratory in Grenoble (France) for two years. His current work deals with scatterometry applied to the characterization of nanoimprint lithographic processes.

Olivier Parriaux has been active in the fields of fibre, integrated and diffractive optics for 30 years at University College London, Moscow Institute of General Physics, in Switzerland at CSEM, in Germany at Friedrich-Schiller-University Jena, and at Twente University, The Netherlands. He is presently leading R&D on resonant gratings from Lyon University at Saint-Etienne, France, with novel applications in laser emission control, in particular radial and azimuthal polarization generation, spectroscopy and sensors. His contributions range from basic concepts to industrial applications.

Thibaut Epalle was born on June 14th 1979 in Saint Etienne, France. He graduated (Master of Science, molecular biology and engineering) from H. Poincaré University (Nancy, France) in 2005. Since 2009, he is working with Jean Monnet University (Saint Etienne, France) in the Mucosal Immunity and pathogenic agents Group (GIMAP EA3064, SFR143, Faculty of Medicine) where he is charge of developing new tools for the detection of Legionella in environmental samples, in particular by means of an optical biosensor.

Svetlen Tonchev received the Ph.D. degree in optical sciences from the Institute of Solid State Physics, Bulgarian Academy of Sciences, where he is currently a senior scientist. After serving as a guest researcher for ten years, he joined the Laboratory Hubert Curien, Saint-Etienne, France. His research interests are in areas of technology and sciences of diffraction gratings, photolithography, integrated optics, Raman and IR-spectroscopy.

Abstract : 3^{ème} colloque national SYMPOLEGIO : *Legionella* : de l'environnement à l'homme 26-27 novembre 2013 Lyon, France

5^{ème} International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, BioMicroWorld2013, Madrid, Espagne 2-4 octobre 2013

Evaluation of the infectivity of viable but non-culturable forms of *Legionella pneumophila* generated after heat shock treatment using macrophage-like U937 and HL-60 cells and *Acanthamoeba polyphaga*

Epalle T., Girardot F., Allegra S., Maurice-Blanc C., Pozzetto B., Riffard S.

Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP), EA 3064, SFR 413, Université de Lyon, 42023 Saint-Etienne, France

Bacteria of the genus *Legionella* are ubiquitous within natural and anthropic aquatic environments. *Legionella pneumophila*, the most frequently associated species with legionellosis - a pneumonia-like disease which has a case-fatality ratio of 20% - is known to invade and replicate within various protozoan species in environmental reservoirs as it grows in macrophages within the lung. Transmission to humans occurs through infectious aerosols from environmental sources. *L. pneumophila* is able to enter a non-replicative viable but non culturable (VBNC) state following different exposures to various stresses. We have previously shown that VBNC forms of *L. pneumophila* obtained after heat shock treatment at 70°C: (1) could be monitored by flow cytometry [1] and; (2) are widespread in hospital water systems after heat treatment procedures aimed at reducing their numbers [2]. In order to investigate if these VBNC forms may be infectious for humans or for natural amoeba reservoirs, three *L. pneumophila* serogroup 1 strains of different origins (Philadelphia GFP 008, clinical 044 and environmental RNN) were shocked at different temperatures ranged from 50 to 70°C, for different times (5, 10, 30 and 60 minutes). VBNC forms were quantified by a flow cytometric assay (FCA) as previously described [1] and cultivated on BCYE agar medium then tested for their capability to infect and/or resuscitate on differentiated macrophage-like cell lines (U937 and HL-60) and *Acanthamoeba polyphaga*. The infection of differentiated macrophage-like cell lines (U937 and HL-60) and *Acanthamoeba polyphaga* was monitored by microscopic observations (internalization of bacteria, cells lysis) and resuscitation of VBNC (recultivation) following plating on BCYE agar medium. To know which temperature can only generate VBNC, all strains were shocked as described above and incubated with amoeba at MOIs of 10 or 100, without washing steps in pages' amoeba saline (PAS 1X) for 4 days at 30°C or 37°C and plated on BCYE at 37°C for 10 days.

The infection of macrophage-like cells was tested with VBNC generated at different temperatures for 5, 10, 30 or 60 min and co-cultured with cells at 37°C, under 5% CO₂, in Hank's Balance Salt Solution (HBSS) without washing steps for 4, 6 and 10 days (MOI 1:1). As control, unshocked cells of all *L. pneumophila* strains were systematically co-cultured under the same conditions.

After 30 minutes at 60°C, VBNC forms could be detected for all *L. pneumophila* strains tested. All these VBNC forms could be resuscitated after culture on *Acanthamoeba polyphaga* but not on macrophage-like cells. Under other conditions of temperature and times of exposure, each *L. pneumophila* strain exhibited a specific response related to its potential to enter into a VBNC state.

Upon a 70°C heat shock [3], VBNC forms were systematically detected after 5 min of treatment (10 to 23% of VBNC depending on the strains). Cells shocked for 5 min (Lp 008) or 30 min (Lp 044 and Lp RNN) were still able to infect amoeba (lysis of cells and resuscitation). However, no resuscitation or cell lysis was evidenced when using U937 and HL-60 cells despite the use of various contact times and culture media.

Our results suggest that heat-generated VBNC forms of *L. pneumophila* are not infectious for macrophage-like cells *in vitro* at a MOI 1:1, whatever the conditions used for their interaction although resuscitation is still possible using amoeba.

There is still a need to investigate if such VBNC forms can be resuscitated on primary culture cells (monocytes isolated from peripheral blood mononuclear cells). Other environmental parameters should also be tested for their capabilities to generate VBNC forms that may be in such a state that they would have the potential to infect and kill human cells. Finally, our preliminary results on the infection of macrophage-like cells following amoebal resuscitation of heat-treated VBNC forms suggest that such VBNC forms may become infectious for humans following a previous interaction with amoeba (at least *Acanthamoeba polyphaga*).

Keywords: *Legionella pneumophila*; VBNC; amoeba, macrophage-like; resuscitation; infectivity.

References

- [1] Allegra *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 2008, **74**: 7813-7816
- [2] Allegra *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 2011, **77**: 1268-1275.
- [3] Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n°2002/243 du 22 avril 2002

Development of an electrochemical immunosensor for the detection of *Legionella pneumophila* VBNC forms in environmental samples.

D. SBOUI^{a,b}, M. SOURI^a, M. BEN ISMAIL^a, T. EPALLE^b, R. MZOUGHIC^c, F. GIRARDOT^b, S. ALLEGRA^b, N. JAFFREZIC^d, S. RIFFARD^b, A. OTHMANE^a

S. Riffard and A. Othmane contributed equally to the work

^aLaboratory of advanced materials and interfaces, Faculty of Medicine, University of Monastir, 5019 Monastir, Tunisia

^bGroupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP), EA 3064, SFR 143, Université Jean Monnet, University of Lyon, F42023, France

^cRegional Laboratory of Hygiene, University Hospital Farhat Hached, 4000 Sousse, Tunisia

^dLaboratoire des Sciences Analytiques - CNRS UMR 5180, Bat. CPE, 43 Bd du 11 Novembre 1918, Université Claude Bernard - Lyon 1, University of Lyon F69622 Villeurbanne Cedex, France

Legionella spp. are widespread in natural and anthropic aquatic environments. They may cause a severe pneumonia in humans (Legionnaires' disease - LD) which may be fatal in almost 20% of cases. *Legionella pneumophila* is by far the species most frequently associated with Legionnaires' disease. Detection of *Legionella* in environmental samples can be made through the use of standardised methods such as cultivation (AFNOR T90-431 or ISO 11731) and PCR (AFNOR T90-471). Both methods are hampered either by their low sensitivity and the time needed to complete the analysis (cultivation) or by their cost and inefficiency to discriminate between live and dead bacteria (PCR). Several attempts have been made to purpose other detection tools such as flow cytometry for instance in a wish to identify Viable But Not Culturable (VBNC) forms of *L. pneumophila* but this method remains technically demanding. The strategies of *L. pneumophila* to adapt and resist to stressful environmental conditions not only include interaction with amoebae and biofilm localisation but also the ability to enter into a VBNC state. The existence of VBNC *L. pneumophila* cells, which may be infectious for humans, in water systems has already been described [1]. Thus, there is still a need to set up detection tools that may have the potential to detect VBNC forms. We have previously elaborated an electrochemical immunosensor for detection and quantification of *L. Pneumophila* [2].

The aim of this study was to elaborate a new electrochemical immunosensor for the detection of VBNC forms of *L. pneumophila*. Our immunosensor was obtained by the immobilisation of a specific monoclonal anti-*L. pneumophila* antibody (MAb), on an indium-tin oxide (ITO) electrode – by Self Assembled Monolayers (SAMs) method using an aminosilane (APTES). The immunosensor was first characterized by wettability (contact angle measurement), atomic force microscopy (AFM), confocal laser scanning microscopy (CLSM), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) in the presence of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ as a redox probe. AFM images and wettability evidenced the functionalization of ITO surface by SAMs of APTES. CV and EIS demonstrated the immobilization of a MAb layer, acting as barrier for the electron transfer between the electrode surface and the redox species in the solution.

VBNC forms of *L. pneumophila* were obtained from artificial water samples after a heat shock treatment of 30 min at 70°C (as recommended by WHO as a water system disinfection procedure). The absence of culturable forms of *L. pneumophila* was first evidenced using both ISO 11731 standard and a flow cytometric assay using propidium iodide and SYTO-9 as viability markers [1]. As shown previously, a 30 min treatment at 70°C has left in the samples only dead cells and VBNC forms of *L. pneumophila* [1].

Specific binding of VBNC *L. pneumophila* cells on our immunosensor was evidenced by CLSM imaging and EIS. A linear relationship between the change in charge transfer resistance (ΔR_c) and the logarithmic concentration value of VBNC was observed in the range of 10^1 to 10^4 CFU/mL with a limit detection 10^1 CFU/mL on artificial samples.

In conclusion, this immunosensor based on EIS has the potential to detect *L. pneumophila* VBNC forms. It may be of interest for water systems surveillance when a contamination by *L. Pneumophila* is suspected provided that the detection limit observed in artificial samples is confirmed in real environmental samples. Further studies are necessary to evaluate its performance on real samples.

Keywords: Immunosensor; Antibody immobilization; *Legionella pneumophila*; VBNC; detection; Electrochemical Impedance Spectroscopy.

References: [1] Allegra S. *et al.* Appl. Environ. Microbiol., 2008, 74: 7813-7816. [2] Souiri M. *et al.* Talanta, 2014, 118: 224-230.

This project was supported by “Conseil régional Rhône-Alpes”, France through its COOPERA call for proposals (2012) and by « Action Intégrée Franco-Tunisienne du Ministère des Affaires Etrangères et Européennes français et du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique tunisien » under No. 12G1123 –No. Egide 26443UH.

Congrès GO2S (Guided Optics and sensor systems) le 04 et 05 février 2013 à St Etienne, France :

Capteur à onde évanescente à excitation par réseau et immobilisation d'une monocouche d'anticorps sur guide en HfO₂ pour la capture et le suivi de la concentration de Legionella pneumophila dans des échantillons environnementaux

T. Epalle¹, O. Parriaux², Y. Jourlin², S. Reynaud², L. Navarro³, F. Gruy³, C. Lambert³, F. Girardot¹, S. Allegra¹, B. Pozzetto¹, S. Riffard¹

¹ Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, EA 3064, SFR 143 IFRESIS, Université de Lyon, F-42023 Saint Etienne, France

² Laboratoire H. Curien, UMR CNRS 5516, Université de Lyon, F-42023 Saint Etienne, France

³ UMR CNRS 5148, IFR 143 IFRESIS, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint Etienne, Université de Lyon, F-42023 Saint Etienne, France.

Résumé :

Depuis la première épidémie de maladie du légionnaire de Philadelphie en 1976, de nombreux épisodes de cas groupés ont été observés dans le monde entier. La prévention de la contamination par les légionelles des systèmes anthropisés fait appel à la culture de la bactérie sur milieu gélosé (normes AFNOR NF T90-431/ ISO 11-731). La présence de flores interférentes, de formes viables non cultivables de légionelles qui réduisent la sensibilité de la culture ont conduit au développement d'autres outils de détection comme l'amplification de l'ADN par la technique qPCR (pour « quantitative » PCR) laquelle bénéficie d'une normalisation par l'AFNOR (T 90-471). Cette technique offre l'avantage de combiner rapidité et sensibilité et de pouvoir permettre une quantification en temps réel des produits amplifiés. Elle reste contrariée par son incapacité à identifier spécifiquement et avec certitudes les formes viables (qu'elles soient cultivables ou non cultivables) et à différencier l'ADN libre d'un échantillon d'ADN associé intracellulaire (en particulier l'ADN de cellules mortes). La technique de détection proposée dans ce projet, basée sur l'immunodétection (capture des bactéries par le biais d'un anticorps monoclonal spécifique dont nous avons l'exclusivité), semble donc, dans le contexte actuel, une piste intéressante qui demande à être développée (Avis de l'Anses relatif aux méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau d'avril 2011-AFSSET/ANSES ARCL 2005, Riffard et al.). Cette technique est basée sur l'immuno-capture des bactéries sur un support d'oxyde d'hafnium (surface du biocapteur =1 cm²). La détection repose sur l'excitation résonnante par réseau d'un guide d'onde diélectrique planaire. Le guide est une couche diélectrique transparente de haut indice de réfraction déposée sur substrat de quartz dont la surface a été gravée périodiquement. L'angle d'incidence et la polarisation d'un faisceau laser à 488 nm de longueur d'onde sont agencés de façon à satisfaire la condition de synchronisme pour l'excitation d'un mode de propagation de la couche de haut indice. L'onde incidente est ainsi couplée dans un mode du guide d'ondes, ce qui s'accompagne d'un fort renforcement du champ électrique dans et à la surface du guide, là où sont immobilisées, par une monocouche d'anticorps, les bactéries marquées qui vont alors émettre un signal fluorescent. Les fluorophores ainsi excités rayonnent dans tout l'espace, en particulier en direction du substrat transparent. Une caméra CCD de haute définition munie d'un filtre dichroïque adapté, placée derrière le substrat, repère les sites fluorescents correspondant aux cellules d'intérêt. Il est alors possible de mesurer la cinétique d'accrochage, d'identifier les formes et de les compter par traitement numérique des images. La caractérisation du transducteur optique a déjà fait l'objet d'une publication (Pietroy D. et al. 2011). Une caractéristique unique du présent transducteur est la propriété de la surface de HfO₂ d'immobiliser les anticorps de capture des cellules sans nécessiter de fonctionnalisation de surface par silanisation. Cette propriété a été testée de plusieurs façons, en particulier par microscopie confocale ainsi que par microscope atomique de force. Cette dernière technique a pu résoudre la présence en surface de HfO₂ d'une monocouche d'anticorps, soit de la présence d'un tapis plus ou moins couvrant de molécules de quelques nanomètres

Mots clés : *Immunocapteur, Legionella pneumophila*

Viabilité des légionelles dans l'environnement: quelques outils d'analyse.

Séverine ALLEGRA, Françoise GIRARDOT, Florence GRATTARD, Thibaut EPALLE, Philippe BERTHELOT, Bruno POZZETTO et Serge RIFFARD.

Les légionelles, bactéries ubiquitaires des environnements aquatiques naturels et anthropiques - dont les réseaux d'eaux chaudes sanitaires (ECS) et les tours aéro-réfrigérantes (TAR) - peuvent être responsables d'une pneumopathie sévère (légionellose). Cette pathologie se déclare après l'inhalation d'aérosols contenant des légionelles. La surveillance des taux de ces bactéries dans l'environnement est basée sur deux méthodes normalisées de détection et de quantification par culture (AFNOR NF T90-431) et par PCR (AFNOR NF T90-471). Ces deux méthodes ne permettent toutefois pas de corrélérer les taux de légionelles détectées à un risque infectieux celui-ci étant en partie seulement dépendant du nombre de bactéries mis en évidence dans un échantillon. En effet, chacune de ces méthodes voit sa sensibilité remise en cause par la présence, dans certains échantillons, de légionelles viables non cultivables (VBNC) et d'inhibiteurs de PCR.

Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse à l'amélioration des méthodes de détection et de quantification des légionelles ; thématique en partie soutenue par l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, anciennement AFSSET) depuis 2006. Ces travaux nous permettent aujourd'hui :

- de mettre en évidence la présence de *Legionella* VBNC dans un échantillon monomicrobien après stress thermique (1) ;
- d'étudier la résistance des *Legionella* aux traitements de décontamination des réseaux d'eaux contaminés (2) ;
- d'évaluer la pertinence d'immuno-captures (3) couplées : à la culture, à des techniques de microscopie à fluorescence, à la cytométrie en flux, à différents biocapteurs (guide d'onde planaire à réseau de diffraction avec excitation holistique de fluorescence par faisceau laser étendu et impédancemétrie) pour la détection et le tri cellulaire des *Legionella* à partir d'échantillons d'eau peu complexes (ECS).

Ces méthodes devraient contribuer à : mieux caractériser l'état physiologique des légionelles dans l'environnement ; mieux cibler les actions préventives ou curatives à mettre en œuvre pour éviter la recolonisation rapide des circuits après un traitement ; lancer une alerte rapide et disposer de la souche (tri cellulaire) pour des études complémentaires (épidémiologie, résistances...) dans le contexte de prévention du « risque *Legionella* ».

Rencontres scientifiques ANSES « De l'émergence à la résurgence des agents biologiques : caractérisation des facteurs de risque pour l'homme », Paris, France, 30 novembre 2011 :

Capteur à onde évanescente à excitation par réseau et immobilisation d'une monocouche d'anticorps sur guide en HfO₂ pour la capture et le suivi de la concentration de *Legionella pneumophila* dans des échantillons environnementaux

Serge Riffard au nom de l'équipe biocapteur_(ENSMSE, UJM).

L'objectif est de mettre au point un outil de diagnostic rapide en temps réel permettant d'évaluer la présence de *L. pneumophila* à partir d'échantillons environnementaux d'origines variées (eau chaude sanitaire, aérosols). La base du projet repose sur une technique d'immuno-capture où seront dénombrés en temps réel à l'aide d'un capteur laser, les événements fixés sur une matrice à caractère innovant (oxyde d'Hafnium). Cette technologie est très fortement susceptible d'être valorisée.

L'originalité du projet repose sur la réalisation d'une analyse quantitative en temps réel de cellules «minoritaires» (légiionelles) dans une suspension complexe. L'analyse doit porter sur de grands volumes (eau et aérosols), et tenir compte des cinétiques de capture et de la morphologie des cellules.

Le microbiocapteur se compose de trois parties. Un système fluidique étanche comprenant une chambre d'écoulement et une pompe péristaltique. Un support plan quartz gravé selon la longueur d'onde de la source lumineuse choisie recouvert d'oxyde d'Hafnium à haut indice de réfraction. Un transducteur composé d'un guide d'onde optique comportant une source d'excitation et d'une caméra numérique haute résolution.

La première étape consiste en la fixation directe des anticorps spécifiques de manière uniforme et saturante sur le support plan quartz. Aucune interaction entre le support ou l'anticorps n'est détectable avec d'autres bactéries potentiellement présentes dans les échantillons environnementaux. Les études en microscopie confocale ne montrent pas d'orientation préférentielle des bactéries sur le support.

Le capteur (support+Ac) est ensuite installé dans la chambre d'écoulement intégrée au système fluidique qui va charrier les bactéries à une vitesse optimisée pour favoriser le contact entre les anticorps et les bactéries qui ont été préalablement marquées. En fin de passage l'échantillon sera de nouveau diffusé pour s'assurer que toutes les cellules ont été fixées, ensuite un liquide neutre éliminera les cellules déposées mais non capturées spécifiquement.

La détection repose sur le principe de résonance par guide d'onde. Un laser argon à 488 nm va générer une onde qui arrive sur l'interface avec un angle d'incidence qui est supérieur à l'angle de réfraction limite, entraînant une réflexion totale de l'onde lumineuse. Une onde évanescente se forme tangentiellement à l'interface vide-capteur, créant un champ électromagnétique confinée au voisinage de l'interface. Ce qui va uniquement exciter les fluorochromes des bactéries fixées aux anticorps. Les bactéries vont émettre une fluorescence qui sera enregistré par une caméra CCD.

Les images seront ensuite traitées par un logiciel d'analyse.

La microscopie à fluorescence a permis d'atteindre un seuil de détection et de quantification de 1000 bactéries par litre (norme AFNOR) dans les conditions de détection en milieu liquide.

La nature très résistante de l'oxyde métallique permet la réutilisation du capteur.

1) Journée scientifique de l'IFRESIS 17 octobre 2013 St Etienne: Evaluation de la pathogénicité des formes viables non cultivable de *Legionella pneumophila*, contre les macrophages-like et les amibes

T. Epalle, S. Allegra, F. Girardot, B. Pozzetto, S. Riffard



EVALUATION DE LA PATHOGENICITE DES FORMES VIBLES NON CULTIVABLE DE *Legionella pneumophila*, VIS A VIS DE CELLULES MACROPHAGES-LIKE ET D' AMIBES

Thibaut EPALLE,

Séverine ALLEGRA, Françoise GIRARDOT, Bruno POZZETTO, Serge RIFFARD



Laboratoire GIMAP, EA3064, Faculté de médecine 15 rue Ambroise Paré 42100 Saint Etienne



INTRODUCTION

- Bactéries du genre *Legionella* : omniprésentes dans les milieux naturels et anthropiques. *Legionella pneumophila* : espèce la plus fréquemment associée à la légionellose capable de se répliquer dans diverses espèces de protozoaires et dans les macrophages alvéolaires.
- Transmission à l'homme par aérosols infectieux provenant de réseaux d'eau (eau chaudes sanitaires, tours aéro-réfrigérantes...).
- Suite à différents stress, *L. pneumophila* capable d'entrer dans un état viable non cultivable (VBNC) caractérisé par une perte de cultivabilité sur milieu BCYE, inhibition de la division cellulaire, métabolisme ralenti, revivification après culture sur amibes ou embryons de poulets.
- VBNC de *L. pneumophila* obtenus après le traitement de choc thermique à 70°C: (1) peuvent être caractérisés par cytométrie en flux et (2) sont très répandus dans les systèmes d'eau même après des procédures de traitement thermique (Allegra *et al.* 2011).
- Objectif de l'étude : évaluation de l'infectiosité des VBNC pour l'homme. Trois souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 (Philadelphia 008, clinique 044 et environnementale RNN) étudiées. VBNC quantifiées par cytométrie en flux et cultivées sur un milieu BCYE. Capacité à infecter et/ou ressusciter testée sur macrophages différenciés (U937 et HL-60) et amibes (*Acanthamoeba polyphaga*) après un choc de 30 min à 70°C selon les recommandations de désinfection de l'organisation mondiale de la santé.

MÉTHODES

Traitement par choc thermique : état physiologique des *L. pneumophila*

2 mL d'une suspension de calibrée à 10⁸ CFU/mL incubée à 70°C pendant 5, 10, 30 et 60 min. Analyse par cytométrie en flux et culture sur milieu BCYE.

Culture sur cellules différenciées (macrophage-like) : pouvoir infectieux des *L. pneumophila* VBNC

Lignées cellulaires différenciées en macrophages (PMA). Après traitement thermique, mise en contact des suspensions avec les macrophages (4 ou 6 jours à 37°C sous 5% CO₂ - MOI de 1 - milieu minimum). Surnageants déposés sur milieu BCYE.

Culture sur tapis amibien : Influence des amibes sur la revivification des formes VBNC

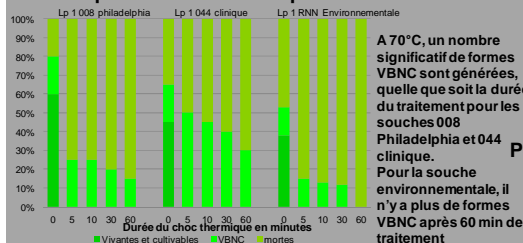
Après le choc thermique les suspensions de *L. pneumophila* mises en contact avec *Acanthamoeba polyphaga* (milieu minimum, 4 jours à 30 ou 37°C - MOI de 10 ou 100). Surnageants déposés sur milieu BCYE.

Culture sur tapis amibien puis sur tapis de macrophage-like : pouvoir infectieux des formes VBNC après revivification sur amibes

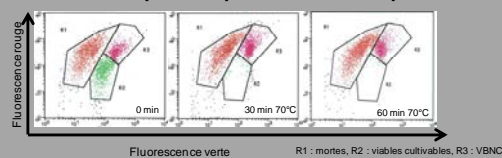
Après le choc thermique les suspensions de *L. pneumophila* mises en contact amibes (4 jours à 37°C - MOI de 10). Surnageants en contact avec les macrophages différenciés (4 jours à 37°C, 5% CO₂) puis étalés sur milieu BCYE.

RÉSULTATS

Etat physiologique de *L. pneumophila* après un choc thermique à 70°C



Analyse par cytométrie en flux de la souche clinique 044 après choc thermique



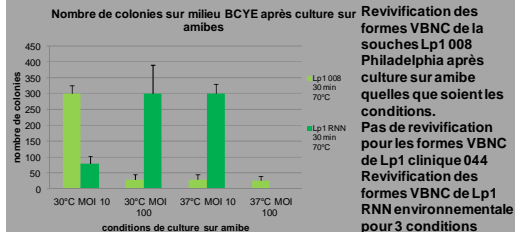
Pouvoir infectieux des *L. pneumophila* VBNC générées par choc thermique de 30 min à 70°C sur les macrophages

	U937		HL60	
	4 jours	6 jours	4 jours	6 jours
008 Non Traitée	+	+	+	+
008 T30 min 70°C	0	0	0	0
044 NT	+	+	+	+
044 T30 min 70°C	0	0	0	0
RNN NT	+	+	+	+
RNN T30min 70°C	0	0	0	0

Les 3 souches « natives » sont capable d'infecter les macrophages. Après le traitement thermique aucune colonies n'est détectée quelle que soit la souche utilisée.

+: présence significative de colonies sur milieu BCYE
0: Absence de colonies sur milieu BCYE

Influence des amibes sur la revivification des formes VBNC générées par choc thermique de 30 min à 70°C



Pouvoir infectieux des formes VBNC de *L. pneumophila* RNN environnementale après revivification sur amibes



Présence significative de colonies après traitement de 30 min à 70°C puis culture sur amibes et ensuite culture sur macrophages.

CONCLUSIONS

- Infections des amibes et des cellules par les 3 souches de *Legionella pneumophila*.
- Réponse spécifique des souches au traitement thermique.
- VBNC générées par choc thermique de 30 min à 70° C non infectieuses pour les macrophages.
- Revivification des formes VBNC après culture sur amibe souche-dépendante.
- Infection des macrophages par les formes VBNC de la souche environnementale après revivification sur amibes.
- Les amibes semblent être aussi un facteur de revivification des formes VBNC de légionelles.

Projet soutenu par la communauté de recherche académique, Région Rhône-Alpes (ARC environnement)

2) 3^{ème} colloque national SYMPOLEGIO : *Legionella* : de l'environnement à l'homme
 26-27 novembre 2013 Lyon, France: AFM, CLSM and EIS characterization of the immobilization of antibodies on indium-tin oxide electrode and their capture of *Legionella pneumophila*.

M. Souiri, D. Sboui, N. Blel, L. Mhamdi, T. Epalle, R. Mzoughi, A. Othmane, S. Riffard



AFM, CLSM and EIS characterisation of the immobilization of the antibodies on indium-tin oxide electrode and their capture of *Legionella pneumophila* in environmental samples

M. Souiri¹, D. Sboui^{1,3}, N. Blel^{1,2}, L. Mhamdi¹, T. Epalle³, R. Mzoughi², S. Riffard³, A. Othmane¹

¹Laboratoire de Biophysique, Faculté de Médecine de Monastir, Tunisie
²Laboratoire Régional d'Hygiène, Hôpital Universitaire Farhat Hached, Sousse, Tunisie
³Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, EA 3064, SFR 143 IFRESIS, Université de Lyon, 42023 Saint Etienne, France.



INTRODUCTION

- *Legionella*: the causative agent of legionnaires' disease (a severe pneumonia which may be fatal).
- Surveillance of *Legionella* in environmental contamination: culture (AFNOR NF T90-431 and ISO 11-731 standards) and real-time PCR assay (AFNOR NF T90-471).
- Due to several limitations of these methods: still a need to develop detection tools.
- Several attempts to develop biosensor-based methods for *L. pneumophila* detection, all hampered so far by a low detection threshold [2, 3].
- Aim of this project: development and validation of a new biosensor based on the immobilization (using a GPTMS epoxysilane) of a monoclonal antibody [1] on indium-tin oxide electrode and Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) for *L. pneumophila* detection in environmental samples.

MATERIALS AND METHODS



RESULTS

Characterisation of bare ITO, ITO - Epoxy and ITO - Epoxy-Antibody surfaces.

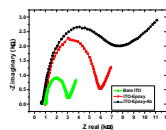


Figure 1: Nyquist diagram of electrochemical impedance spectra recorded in 5mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} solution (0.16 M PBS, pH = 7.2) after different modifications. Bare ITO electrode, ITO-Epoxy electrode and ITO - Epoxy - Antibody.

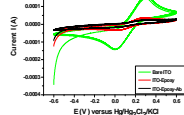


Figure 2: Cyclic voltammograms recorded on bare ITO electrodes (green curve) followed by ITO-epoxy 2% epoxysilane (CCl₄ silane, v/v) (red curve) and ITO-epoxy-Ab (20 µl of a 2.36 µg.µL⁻¹) (black curve).

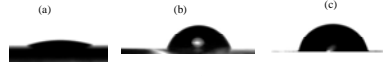


Figure 3: Contact angle values for different surfaces (a) bare ITO electrode, (b) bare ITO - Epoxy electrode and (c) bare ITO - Epoxy- Antibody electrode.

Detection of *Legionella pneumophila* sg1 with ITO-Epoxy-antibody biosensor

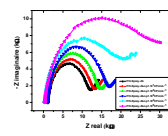


Figure 4: Nyquist diagram of electrochemical impedance spectra after immobilization of bacteria detection. ITO - Epoxy - Antibody, bacterial detection: 10¹ CFU.ml⁻¹, 10² CFU.ml⁻¹, 10³ CFU.ml⁻¹, 10⁴ CFU.ml⁻¹, 10⁵ CFU.ml⁻¹.

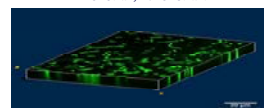


Figure 5: CLSM image of the specific binding of *L. pneumophila* sg1 cells

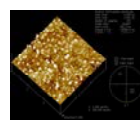


Figure (a)

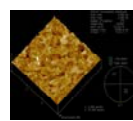


Figure (b)

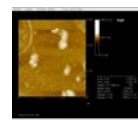


Figure (c)

Figure 6: AFM image in tapping mode of (a) an uncoated bare ITO electrode; (b) an ITO chip coated with monolayer of epoxysilane; (c) an epoxysilane layer modified by anti-*L. pneumophila* antibodies.

Confirmation of the AFM characterization through measuring of the contact angles (Fig.3).

AFM characterization (Fig.6) has confirmed modifications of the ITO electrode

L. pneumophila attachment onto the electrode surface was verified using a Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) (Fig.5).

High sensitivity of *L. pneumophila* sg1 detection (artificial samples) within a 10⁵ to 10¹ CFU.ml⁻¹ range with the ITO - Epoxy -Antibody electrode (Fig. 4). At this stage of development, the detection limit of bacteria is 10¹ CFU.ml⁻¹.

REFERENCES

[1] S. Allegra, F. Girardot, F. Grattard, P. Berthelot, JH .Helbig, B. Pozetto and S. Riffard. Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve *Legionella pneumophila* serogroup 1 recovery from environmental samples. J. Appl. Microbiol. (2011).
 [2] IR. Cooper, ST. Meikle, G. Standen, GW. Hanlon and M. Santin, The rapid and specific real time detection of *Legionella pneumophila* in water samples using Optical Waveguide Light mode Spectroscopy. J. Microbiol. Meth. (2009).
 [3] BK. Oh, W. Lee, WH. Lee, JW. Choi. Immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* based on imaging ellipsometry. Mater. Sci. Eng. C (2004).

DISCUSSION & CONCLUSION

- This GPTMS-based immunosensor was very sensitive to changes in bacterial concentrations and was able to successfully detect *Legionella pneumophila* serogroup 1 in concentrations (artificial samples) varying from 10¹ to 10⁵ CFU. ml⁻¹ within a detection time of 3 minutes.
- The proposed immunosensor system has the advantage of allowing an operational simplicity.
- Still a need to evaluate its performance against real samples.
- Several improvements will be tested using different coating methods of the detection antibody in order to improve its sensitivity.
- This work has been accepted for publication in Talanta (October 2013, in press).

Acknowledgments: this study was conducted through the financial support of PHC Utique (Action Intégrée Franco-Tunisienne du Ministère des Affaires Etrangères et Européennes français et du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique tunisien) under project N° 12G1123(N° Egidé 26443UH) and Région Rhône-Alpes, France (COOPERA 2012 project).
SympoLegio Legionella, Lyon France, November 26 – 27, 2013

Résumé:

Legionella pneumophila, l'agent responsable de la légionellose est transmissible à l'Homme par les aérosols environnementaux et infecte les macrophages pulmonaires. Elle peut également se répliquer dans diverses espèces de protozoaires présents dans les réservoirs environnementaux. Après l'exposition à différents stress *L. pneumophila* est capable de d'entrer dans un état Viable Non Cultivable (VBNC) qui semble être une stratégie de survie.

L'objectif de nos travaux était d'étudier l'état VBNC de différentes souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 après des traitements thermique et chimique et d'évaluer le pouvoir infectieux des formes VBNC envers les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires.

Dans un premier temps nous avons étudié les profils physiologiques de *L. pneumophila* séro groupe 1 de trois souches différentes (Philadelphia GFP 008, clinique 044 et environnementale RNN). Pour les trois souches nous avons observé la présence de bactéries VBNC à l'état natif. Les résultats montrent que pour chaque souche 3 populations peuvent être identifiées, les légionelles viables cultivables, les VBNC et les bactéries mortes. Lorsque soumises aux stress, nous avons observé que chaque souche possédait un profil physiologique propre et la présence ou non de bactéries VBNC était dépendante du traitement appliqué et de la souche utilisée.

La deuxième partie fut relative à l'étude du comportement de ces VBNC lorsqu'elles étaient cultivées en présence de macrophages ou de cellules épithéliales. L'étude a porté sur des traitements thermiques de 70°C pendant 30 min et des chocs au dioxyde de chlore de 4, 6 et 7 mg/L pendant 60 min à température ambiante. Les résultats montrent qu'aucune légionelle VBNC n'est capable de se développer au sein des cellules et aucune croissance sur milieu BCYE n'a été observée après co-culture.

La suite de notre étude a été d'étudier le comportement, envers les macrophages, de *L. pneumophila* revivifiées après culture sur amibes. Les résultats montrent que les légionelles VBNC induites par choc thermique et revivifiées par co-culture sur *Acanthamoeba polyphaga* sont capables d'infecter de nouveau les macrophages.

En conclusion, ces résultats suggèrent que: (i) les formes VBNC de *L. pneumophila* ne sont pas spontanément infectieuses pour les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires *in vitro* et (ii) elles peuvent devenir pathogènes pour les cellules humaines après revivification préalable sur une amibe (*A. polyphaga*) selon le stress appliqué.

Mots-clés: VBNC, *L. pneumophila*, choc thermique, choc ClO₂, amibe, macrophage, revivification

Abstract:

Legionella pneumophila, the causative agent of legionellosis is transmitted to human through aerosols from environmental sources and invades lung's macrophages. It also can replicate within various protozoan species in environmental reservoirs. Following exposures to various stresses, *L. pneumophila* enters a Viable Non Cultivable state (VBNC) which is likely to be a survival strategy.

The objective of our work was to study the VBNC forms of several strains of *L. pneumophila* serogroup 1 obtained after thermal and chemical treatments and to evaluate the infectivity of these VBNC forms against macrophages and alveolar epithelial cells.

First we studied the physiological patterns of the three different strains (Philadelphia GFP 008, 044 clinical and environmental RNN). For all strains we observed the presence of VBNC bacteria in the native (non stressed) state. The results show that for each strain, three populations of *Legionella* can be identified: viable and culturable, VBNC and dead cells. Once submitted to the various stresses, we observed that each strain had its own physiological pattern and the presence (or not) of VBNC bacteria was dependent on the applied treatment and the strain used.

The second part was related to the study of the pathogenicity of these VBNC forms against macrophages or epithelial cells. The study focused on heat shock treatment at 70°C for 30 min and chlorine dioxide treatment at 4, 6 and 7 mg/L for 60 min at room temperature. The results show that no *Legionella* VBNC forms were able to grow within the cells and no growth on BCYE medium was observed after co-culture.

Then we investigated the behavior of *L. pneumophila* resuscitated after culture on amoeba within macrophages. The results shows that some *Legionella* VBNC induced by heat shock treatment and resuscitated by *Acanthamoeba polyphaga* co-culture are able to infect macrophages.

In conclusion, these results suggest that: (i) the VBNC forms of *L. pneumophila* are not infectious for macrophages and alveolar epithelial cells *in vitro* and; (ii) some of them can be pathogenic for human cells after revivification by an amoeba (*A. polyphaga*).

Keywords: VBNC, *L. pneumophila*, heat shock, chlorine dioxide treatment, amoeba, macrophage-like cell, resuscitation