



HAL
open science

Développement et évaluation d'un micro-biocapteur électrochimique pour l'immuno-détection en temps réel de *Legionella pneumophila* dans les échantillons environnementaux

Dejla Sboui

► **To cite this version:**

Dejla Sboui. Développement et évaluation d'un micro-biocapteur électrochimique pour l'immuno-détection en temps réel de *Legionella pneumophila* dans les échantillons environnementaux. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon; Université de Monastir (Tunisie), 2016. Français. NNT : 2016LYSES046 . tel-01801458

HAL Id: tel-01801458

<https://theses.hal.science/tel-01801458>

Submitted on 28 May 2018

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.



العهد العالي للبيوتكنولوجيا بالمنستير
INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE MONASTIR



N°d'ordre NNT : xxx

**THESE de DOCTORAT EN COTUTELLE ENTRE
L'UNIVERSITE DE LYON & L'UNIVERSITE DE MONASTIR**

Opérée au sein de
**L'Université Jean Monnet à Saint-Etienne
&
L'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir à l'Université de Monastir**

**Ecole Doctorale N° EDSIS 488
Sciences Ingénierie Santé**

**Ecole Doctorale N° ED-SBBS...
Sciences Biologiques, Biotechnologie et Santé**

Spécialité de doctorat :

Discipline : Sciences biologiques et biotechnologie

Soutenue publiquement le 21/10/2016, par :

Dejla SBOUI

**Développement et évaluation d'un micro-biocapteur
électrochimique pour l'immuno-détection en temps réel de
Legionella pneumophila dans les échantillons environnementaux**

Devant le jury composé de :

| | | |
|-------------------------------|---|-----------------------------------|
| Mme Jaffrezic-Renault, Nicole | Directrice de Recherche CNRS, Université Claude Bernard Lyon-1 | Rapporteur |
| Mr Kenani, Abderraouf | Professeur, Université de Monastir | Rapporteur |
| Mme Fourati, Najla | Maître de Conférences, CNAM | Examinatrice |
| Mr Mzoughi, Ridha | Professeur, Université de Monastir | Examineur et Président |
| Mr Riffard, Serge | Professeur, Université de Jean Monnet Saint-Etienne | Co-directeur de thèse |
| Mr Othmane, Ali | Professeur, Université de Monastir | Co-directeur de thèse |

Liste des abréviations

AA : Acides aminés

ADN : Acide désoxyribonucléique (DNA : Deoxyribonucleic acid)

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AFM : Atomic Force Microscopy (Microscope à force atomique)

AFNOR : Agence française de normalisation

Ag : Antigène

AMV-RT : Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase

APTES : (3-Aminopropyl)triéthoxysilane

ARN : Acide ribonucléique (RNA : ribonucleic acid)

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNr 16S : Acide ribonucléique ribosomique 16S (petite unité de ribosome)

ATP : Adénosine triphosphate

BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract (Milieu de culture de *Legionella*)

BOD : Biochemical oxygen demand (Demande biochimique en oxygène)

CAP : Pili bactérien de type IV

CCl₄ : Tétrachlorure de carbone

C_{DL} : Capacité de la double couche

CDR : Complementary-Determining Regions

C_H : Domaine constant

CH₃ : Méthyle

Cl : Chlore

ClO₂ : Dioxyde de chlore

CLSM : Confocal laser scanning microscopy (Microscope confocal à balayage laser)

cm : Centimètre

COOH : Fonction carboxyle

Ct : Cycle seuil

CV : Cyclic voltammetry (Voltamétrie cyclique)

DGS : Direction générale de la santé en France

DO : Densité optique

E : potentiel

ECS : Eau chaude sanitaire

ERCS : Electrode de référence au calomel saturé

EDC : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Dosage immuno-enzymatique)

E-S : Enzyme-Substrat

f : Fréquence

Fab : Fragment antigen binding (Fragment de fixation de l'antigène)

Fc : Fragment cristallisable

FCA : Flow Cytometry Assay (Cytométrie en flux)

FDA : Fluorescéine di-acétate

[Fe(CN)₆]^{3-/4-} : Couple d'oxydoréduction ferro-ferricyanure

FISH : Fluorescence in situ hybridization (hybridation fluorescente in situ)

GFP : Green fluorescent protein (protéine fluorescente verte)

GPTMS : (3-Glycidoxypropyl)triméthoxysilane

GU : Unités génomiques

GVPC : Milieu de culture sélectif de *Legionella* à base de Glycine, Vancomycine, Polymyxine et Colistine

GVPN : Milieu de culture sélectif de *Legionella* à base de Glycine, Vancomycine, Polymyxine et Natamycine

HBS : Hepes buffered saline (Une solution saline tamponnée par HEPES)

Hg : Mercure

HIV : Human immunodeficiency virus (virus de l'immunodéficience humaine)

Hsp : Heat shock protein (Protéine de choc thermique)

Hz : Hertz

H₂O : Eau

H₂O₂ : Eau oxygénée

I : Courant

I_c : Courant capacitif

I_f : Courant faradique

IFI ou IFAT : Indirect fluorescent antibody test (Test d'immunofluorescence indirecte)

Ig : Immunoglobuline

IgA : Immunoglobuline de type A

IgD : Immunoglobuline de type D

IgE : Immunoglobuline de type E

IgG : Immunoglobuline de type G

IgM : Immunoglobuline de type M

IMS : Immunomagnetic separation (Séparation immunomagnétique)

ITO : Indium tin oxide (oxyde d'indium-étain)

K : Potassium

kDa : Kilodalton

kHz : KiloHertz

kJ : KiloJoule

KOH : Hydroxyde de potassium

L : Litre

LAMP 1 : Lysosomal-associated membrane protein 1 (protéines de membrane 1 associées au lysosome)

L. p. : *Legionella pneumophila*

Lp1 : *Legionella pneumophila* sérogroupe 1

Lp2-14 : *Legionella pneumophila* sérogroupe 2-14

LPS : Lipopolysaccharide

MAb : Monoclonal Antibody (Anticorps monoclonal)

MEB : Microscopie électronique à balayage

MES : Acide 2-(N-morpholino)éthane-sulfonique

mg : Milligramme

Mip : (Macrophage infectivity potentiator)

MIP : Molecular Imprinted Polymer (Polymère à empreinte moléculaire)

mL : Millilitre

mM : Millimolaire

MOMP : Major outer membran protein (Protéine majeure de la membrane externe)

mV : Millivolt

Na : Sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NH₂ : Fonction amine

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium

NHS : N-hydroxysuccinimide

nm : Nanomètre

nN : Nanonewton

NT : Bactéries non traitées

OH : Groupement hydroxyle

ONTT : Office national du tourisme tunisien

OWLS : Optical waveguide light mode spectroscopy (Spectroscopie de mode de lumière de guide d'onde optique)

PAL : Peptidoglycan-associated lipoprotein (Lipoprotéine associée à un peptidoglycane)

PBS : Le tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline)

PCR : Polymerase chain reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)

PI : Propidium iodide (iodure de propidium)

PVC : Chlorure de polyvinyle

PYG : Peptone-yeast-glucose broth

q-PCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative

R² : Coefficient de corrélation

redox : Oxydoréduction

RER : Réticulum endoplasmique rugueux

RMS : Root mean square height (Rugosité de surface)

RNase : Ribonucléase

rpm : rotation per minute (Tour par minute)

Rs : Résistance de la solution

R_{TC} : Résistance de transfert de charge

RT-PCR : Real time PCR (Réaction en chaîne par polymérase en temps réel)

SAMs : Self assembled monolayers (Monocouches auto-assemblées)

SELEX : Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment

Sg 1 : Séro groupe 1

SIE : Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)

S-NHS : Dérivés sulfonés de N-hydroxysuccinimide

Sp : Maximum peak height (Hauteur maximale de saillie du profil)

SPR : Surface plasmon resonance (Surface de la résonance de plasmon)

Sv : Maximum pit height (Profondeur maximale de creux)

T : Bactéries traitées

TAR : Tours aéro-réfrigérantes

TMB : Tétraméthylbenzidine

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultra violet

V : Volt

VBNC : Viable but non culturable (forme de *Legionella* viable mais non cultivable)

VC : Bactéries viables et cultivables

V_H : Domaine variable

WHO : World Health Organization (organisation mondiale de la santé)

Z(ω) : Impédance de Warburg

3D : 3 dimensions

μL : Microlitre

γ_{LS} : Tension superficielle liquide-solide

γ_{SG} : Tension superficielle solide-gaz

γ_{LG} : Tension superficielle liquide-gaz

Ω : Ohm

ΔR_{TC} : Variation de la résistance de transfert de charge

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 3 |
| I. Les légionelles | 3 |
| I.1. Introduction..... | 3 |
| I.2. Historique | 4 |
| I.3. Définition | 4 |
| I.4. Virulence..... | 6 |
| I.5. Ecologie..... | 7 |
| I.5.1. Interaction avec les amibes | 9 |
| I.5.2. Colonisation des biofilms..... | 10 |
| I.6. Les différentes techniques de détection de <i>Legionella</i>..... | 11 |
| I.6.1. Culture..... | 11 |
| I.6.1.1. Echantillons environnementaux | 11 |
| I.6.1.2. Echantillons cliniques..... | 12 |
| I.6.2. Mise en évidence d'antigène soluble dans les urines..... | 13 |
| I.6.3. Sérologie et immunofluorescence indirecte | 14 |
| I.6.4. Méthodes moléculaires..... | 16 |
| I.6.4.1. PCR (Réaction de polymérisation en chaîne)..... | 16 |
| I.6.4.2. La PCR en temps réel (Norme AFNOR NF T90-471, juin 2015)..... | 17 |
| I.6.4.3. La méthode de l'hybridation fluorescente in situ (FISH)..... | 18 |
| I.6.5. La séparation immuno-magnétique (IMS) | 18 |
| I.7. Contrôle de <i>Legionella pneumophila</i> dans l'environnement..... | 19 |
| I.7.1. Traitement thermique | 19 |
| I.7.2. Traitement par le dioxyde de chlore ClO ₂ | 20 |
| I.8. Les formes viables mais non cultivables de <i>L. pneumophila</i> (VBNC)..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| I.8.1. Définition de l'état VBNC | 21 |
| I.8.2. Modifications morphologiques et physiologiques | 21 |
| I.8.3. La virulence..... | 22 |
| I.8.4. La ressuscitation..... | 22 |
| I.8.5. La détection..... | 23 |
| I.8.5.1. Cytométrie en flux (FCA)..... | 23 |
| I.8.5.2. Co-culture sur amibes <i>Acanthamoeba polyphaga</i> | 26 |
| I.8.5.2.1. Attachement et phagocytose | 27 |
| I.8.5.2.2. Adaptation de phagosome et évitement de protéolyse..... | 28 |
| I.8.5.2.3. Réplication intracellulaire | 28 |
| I.8.5.2.4. Echappement de la cellule hôte..... | 29 |
| I.9. Etat de l'art des biocapteurs à <i>Legionella</i> | 29 |
| II. Les capteurs..... | 35 |
| II.1. Introduction | 35 |
| II.2. Historique..... | 35 |
| II.3. Définition..... | 35 |
| II.4. Domaine d'application des biocapteurs | 36 |
| II.5. Principe de fonctionnement d'un biocapteur | 36 |
| II.6. Classification des biocapteurs | 37 |
| II.7. Description du biocapteur | 38 |
| II.7.1. Biorécepteur..... | 38 |
| II.7.2. Le transducteur..... | 46 |
| III. Techniques d'immobilisation de biorécepteur sur substrat solide | 48 |
| III.1. Adsorption directe sur substrat solide..... | 49 |
| III.2. Emprisonnement physique | 49 |
| III.3. Réticulation | 50 |

| | |
|--|-----------|
| III.4. Accrochage covalent des biorécepteurs | 50 |
| III.4.1. Immobilisation covalente par des polymères | 51 |
| III.4.2. Immobilisation covalente par SAMs | 52 |
| IV. Caractérisation de transducteur par des mesures électrochimiques..... | 55 |
| IV.1. Etude par voltamétrie cyclique (CV) | 55 |
| IV.2. Etude par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)..... | 57 |
| IV.3. Modélisation électrique | 60 |
| CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES | 63 |
| Introduction | 63 |
| I. Matériel biologique | 63 |
| II. Méthodes microscopiques | 64 |
| II.1. Microscope à fluorescence | 64 |
| II.1.1. Principe | 64 |
| II.1.2. Dispositif expérimental | 67 |
| II.2. Microscope à force atomique (AFM)..... | 68 |
| II.2.1. Principe | 68 |
| II.2.2. Dispositif expérimental | 68 |
| II.3. Microscope confocal (CLSM)..... | 71 |
| II.3.1. Principe | 71 |
| II.3.2. Dispositif expérimental | 72 |
| III. Cytométrie en flux (FCA) | 73 |
| III.1. Principe | 73 |
| III.2. Dispositif expérimental | 74 |
| IV. PCR quantitative (q-PCR) : | 75 |
| V. Co-culture sur <i>Acanthamoeba polyphaga</i>..... | 76 |
| VI. Techniques de caractérisation physico-chimique des substrats modifiés | 77 |

| | |
|---|-----------|
| VI.1. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) | 77 |
| VI.1.1 Principe..... | 77 |
| VI.1.2. Dispositif expérimental | 77 |
| VI.1.2.1. Cellule électrochimique | 78 |
| VI.1.2.2. Electrode de travail | 79 |
| VI.1.2.3. Electrode de référence..... | 80 |
| VI.1.2.4. Electrode auxiliaire | 80 |
| VI.2. Voltamétrie cyclique (CV) | 80 |
| VI.3. Mesure de l'angle de contact | 81 |
| VI.3.1. Principe..... | 81 |
| III.3.2. Dispositif expérimental..... | 81 |
| VII. Méthodes de fonctionnalisation de surface d'ITO par les monocouches auto- assemblées (SAMs) | 82 |
| VII.1. Epoxysilane | 83 |
| IV.2. Aminosilane | 83 |
| VIII. Application sur des échantillons environnementaux | 84 |
| CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION | 87 |
| Introduction | 87 |
| I. Etude du biocapteur à base d'époxysilane | 87 |
| I.1. Caractérisation physico-chimique des surfaces modifiées par l'époxysilane (GPTMS) | 87 |
| I.1.1. Mesure de l'angle de contact..... | 87 |
| I.1.2. Imagerie AFM | 88 |
| I.1.3. Spectroscopie d'impédance électrochimique | 92 |
| I.1.4. Voltamétrie cyclique | 93 |
| I.2. Evaluation de la détection de <i>L. pneumophila</i> | 94 |
| I.2.1. Microscopie confocale à balayage (CLSM)..... | 95 |

| | |
|---|------------------------------------|
| I.2.2. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) | 96 |
| II. Etude du biocapteur à base d'aminosilane..... | 99 |
| II.1. Caractérisation physico-chimique de surface modifiée par l'aminosilane (APTES) | 99 |
| II.1.1. Mesure de l'angle de contact | 99 |
| II.1.2. Imagerie AFM..... | 100 |
| II.1.3. Microscopie confocale à balayage (CLSM) : | 104 |
| II.1.4. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) : | 104 |
| II.2. Elaboration de l'immunocapteur et évaluation de la détection des formes VBNC de <i>L. pneumophila</i>..... | 107 |
| II.2.1. Co-culture sur amibe <i>Acanthamoeba polyphaga</i> : | 107 |
| II.2.2. La technique de PCR quantitative (q-PCR) : | 108 |
| II.2.3. La cytométrie en flux (FCA) : | 110 |
| III. Evaluation de l'immunocapteur dans sa version APTES sur des échantillons environnementaux réels :..... | 119 |
| CONCLUSION GENERALE | 127 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | ERREUR ! SIGNET NON DEFINI. |
| PARTICIPATIONS SCIENTIFIQUES | 164 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Cycle de vie de <i>Legionella pneumophila</i> | 11 |
| Figure 2 : Principe du test d'immuno-fluorescence indirecte | 15 |
| Figure 3 : Structure chimique de molécule de PI..... | 25 |
| Figure 4 : Représentation schématique d'un biocapteur | 37 |
| Figure 5 : Classification des biocapteurs..... | 37 |
| Figure 6 : Représentation schématique de quelques biorécepteurs..... | 38 |
| Figure 7 : Principe de la réaction catalytique d'un enzyme (type protéase) | 39 |
| Figure 8 : Représentation schématique d'un anticorps et de la partie se liant à l'antigène, le paratope | 45 |
| Figure 9 : Formation des monocouches auto-assemblées sur un support solide..... | 52 |
| Figure 10 : Schéma de base d'une molécule amphiphile pouvant former une couche SAM .. | 54 |
| Figure 11 : Immobilisation covalente de biorécepteurs sur une surface d'ITO par l'intermédiaire d'une monocouche auto-assemblée de silane..... | 54 |
| Figure 12 : Voltamétrie cyclique. (A) : forme du potentiel appliqué ($E = f(t)$), (B) : réponse en courant $I = f(E)$ | 56 |
| Figure 13 : Diagramme de phase pour une tension alternative | 58 |
| Figure 14 : Diagramme de Nyquist représentant $-Z_{im}$ en fonction de Z_{re} | 59 |
| Figure 15 : Circuit électrique de Randles | 60 |
| Figure 16 : Diagramme de Bode représentant $\log Z = f(\log(\omega))$ | 61 |
| Figure 17 : Principe de la fluorescence et diagramme de Jablonsky. La flèche rouge indique le processus d'absorption, la flèche bleue celui de la relaxation non-radiative dans l'état excité et la flèche verte exprime la fluorescence | 65 |
| Figure 18 : Principe du microscope à fluorescence à angle droit..... | 67 |
| Figure 19 : Architecture principale d'un AFM | 69 |
| Figure 20 : Présentation de la courbe des forces appliquées par la pointe selon les différents modes de balayage | 70 |

| | |
|--|-----|
| Figure 21 : Principe du microscope confocal (CLSM) | 72 |
| Figure 22 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux..... | 74 |
| Figure 23 : Montage de mesures électrochimiques..... | 78 |
| Figure 24 : Schéma de la cellule électrochimique à trois électrodes | 79 |
| Figure 25 : Electrode de référence au calomel saturé (ERCS)..... | 80 |
| Figure 26 : Appareil Digit Drop et principe de mesure de l'angle de contact | 81 |
| Figure 27 : Forces appliquées sur une goutte d'eau posée sur un support solide..... | 82 |
| Figure 28 : Images AFM de surface d'ITO nue avant (A) et après (B) nettoyage..... | 89 |
| Figure 29 : Images AFM des différentes surfaces : ITO nu après nettoyage (A), ITO-GPTMS (B), ITO-GPTMS-MAb (C) | 91 |
| Figure 30 : Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance électrochimique pour l'électrode d'ITO nue (courbe verte), ITO-GPTMS (courbe rouge) et ITO-GPTMS-MAb (courbe noire) en présence du couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ | 92 |
| Figure 31 : Voltammogrammes cycliques de l'électrode d'ITO nue (courbe verte), ITO-GPTMS (courbe rouge) et ITO-GPTMS-MAb (courbe noire), en solution PBS (0.16 M, pH = 7.2)..... | 94 |
| Figure 32: Schéma des étapes de l'élaboration de l'immunocapteur ITO-GPTMS-MAb-Lp195 | |
| Figure 33 : Image CLSM en 3D de l'électrode ITO-GPTMS-MAb après immobilisation de 5.10^6 UFC/mL de <i>Legionella pneumophila</i> non traitée | 96 |
| Figure 34 : Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance électrochimique après l'immobilisation des anticorps (ITO-GPTMS-MAb) et la détection des bactéries (10^1 UFC/mL, 10^2 UFC/mL, 10^3 UFC/mL, 10^4 UFC/mL et 10^5 UFC/mL) | 97 |
| Figure 35: Variation de la résistance de transfert de charge en fonction des concentrations logarithmiques de <i>L. pneumophila</i> | 98 |
| Figure 36: Images AFM pour l'électrode d'ITO nue après nettoyage (A), ITO-APTÉS (B) et ITO-APTÉS-MAb (C), | 101 |
| Figure 37 : Image CLSM en 3D de l'immobilisation de l'anticorps anti- <i>L. pneumophila</i> | 104 |

| | |
|---|-----|
| Figure 38 : Spectres de Nyquist obtenus pour ITO nu (courbe noire), ITO-APTES (courbe rouge) et ITO-APTES-MAb (courbe verte). Le schéma inséré montre le circuit équivalent de Randles..... | 105 |
| Figure 39: Voltammogrammes cycliques de l'électrode d'ITO nue (courbe noire), ITO-APTES (courbe rouge) et ITO-APTES-MAb (courbe verte), en solution PBS (0.16 M, pH = 7.2)..... | 106 |
| Figure 40: Schéma des différentes étapes de l'élaboration de l'immunocapteur ITO-APTES-MAb-Lp1 (VBNC)..... | 107 |
| Figure 41 : Schéma de la plaque de 96 puits pour la technique de la PCR quantitative en temps réel | 109 |
| Figure 42 : Courbes de calibration standard pour les valeurs de Ct en fonction des log des concentration des formes non-traitées et traitées de <i>L. pneumophila</i> | 110 |
| Figure 43 : Evaluation des caractéristiques d'une suspension de 10^6 UFC/mL de <i>L. pneumophila</i> par la cytométrie en flux, avant (A) et après (B) le traitement thermique de 70 °C pendant 30 min (R1 : Cellules mortes, R2 : Cellules viables et cultivables, R3 : VBNC)..... | 111 |
| Figure 44 :Diagrammes de Nyquist obtenus pour des concentrations croissantes des formes non traitées de <i>L. pneumophila</i> ; (■) sans bactéries, (■) 10^1 UFC/mL, (■) 10^2 UFC/mL, (■) 10^3 UFC/mL, (■) 10^4 UFC/mL et (■) 10^5 UFC/mL | 114 |
| Figure 45 :Variation relative de la R_{TC} en fonction du logarithmique de la concentration de bactéries non traitées (courbe noire) et traitées par la chaleur (courbe rouge) de <i>L. pneumophila</i> | 115 |
| Figure 46 : Diagrammes de Nyquist obtenus pour des concentrations croissantes des formes traitées de <i>L. pneumophila</i> ; (■) sans bactéries, (■) 10^1 UFC/mL, (■) 10^2 UFC/mL, (■) 10^3 UFC/mL, (■) 10^4 UFC/mL et (■) 10^5 UFC/mL | 115 |
| Figure 47 : Image CLSM en 3D pour l'électrode ITO-APTES-MAb après immobilisation des formes traitées de <i>L. pneumophila</i> (10^6 UFC/mL)..... | 116 |
| Figure 48 : Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance électrochimique après l'immobilisation des anticorps (ITO-APTES-MAb) et la détection d' <i>Enterococcus faecalis</i> (10^1 UFC/mL, 10^2 UFC/mL, 10^3 UFC/mL, 10^4 UFC/mL et 10^5 UFC/mL) | 117 |

| | |
|--|------------------------------------|
| Figure 49 : Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance électrochimique après l'immobilisation des anticorps (ITO-APTES-MAb) et la détection d' <i>Escherichia coli</i> (10^1 UFC/mL, 10^2 UFC/mL, 10^3 UFC/mL, 10^4 UFC/mL et 10^5 UFC/mL) | 118 |
| Figure 50 : Variation relative de la R_{TC} en fonction des valeurs logarithmiques des concentrations de formes non traitées de <i>L. pneumophila</i> (courbe rouge), de formes traitées de <i>L. pneumophila</i> (courbe noire), <i>Enterococcus faecalis</i> (courbe verte) et <i>Escherichia coli</i> (courbe bleue)..... | Erreur ! Signet non défini. |
| Figure 51 : Variation relative de la R_{TC} en fonction du logarithme de la concentration de bactéries viable <i>L. pneumophila</i> sg1 (en UFC mL ⁻¹) | <u>12020</u> |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1: Etat de l'art des biopuces pour la détection de <i>Legionella pneumophila</i> | 31 |
| Tableau 2: Etat de l'art des immunocapteurs pour la détection de <i>Legionella pneumophila</i> ... | 33 |
| Tableau 3 : Angles de contact des surfaces d'ITO étudiées avant et après modification par le GPTMS..... | 88 |
| Tableau 4 : Angles de contact des surfaces d'ITO étudiées avant et après modification de surface par l'APTES..... | 100 |
| Tableau 5 : Paramètres de la rugosité de la surface d'ITO nue après nettoyage, ITO-APTES et ITO-APTES-MAb..... | 102 |
| Tableau 6 : Résultats des échantillons bactériens (avant et après traitement) représentés par le nombre de cycles nécessaires pour l'amplification des molécules d'ADN | 109 |
| Tableau 7 : Moyenne de la variation relative de la résistance de transfert de charge et concentrations des bactéries <i>L. pneumophila</i> dans différents échantillons réels | 121 |

Introduction générale

L'évaluation ainsi que la détection des espèces bactériennes pathogènes, présentes dans l'environnement, nécessitent l'intervention des moyens d'analyse et d'identification très performants et assez coûteux. Une alternative consiste à modéliser des dispositifs avec des critères équivalents en termes de spécificité, fiabilité, rapidité, simplicité, à plus faibles coûts. Parmi ceux-ci, les capteurs, basés sur des méthodes électrochimiques, peuvent constituer une alternative prometteuse.

En effet, ces dernières décennies ont vu l'apparition des capteurs biologiques appelés plus souvent des biocapteurs. Ces nouveaux dispositifs d'analyse ont connu un développement assez remarquable grâce aux demandes de contrôle (notamment en hygiène) dans différents domaines tels que l'environnement, l'alimentation, la sécurité domestique et industrielle ... Généralement, la conception de biocapteur est basée sur l'association d'une entité biologique faisant office de biorécepteur à un transducteur physique. Ce biorécepteur assure la bio-reconnaissance lors de l'interaction avec l'analyte cible. Cette bio-reconnaissance est aisément mesurable et peut être directement associée à la concentration de l'analyte cible présente dans l'échantillon à analyser (grâce au transducteur, suite à la génération d'un signal électrique par exemple).

De manière générale, trois types de biomolécules spécifiques jouent le rôle de biorécepteurs, donnant naissance respectivement à des biopuces, des capteurs enzymatiques et des immunocapteurs : les acides nucléiques (ADN, ARN), les enzymes et les immuno-espèces (antigènes, anticorps). Dans le cas de l'immunocapteur, l'identification (d'un antigène par un anticorps ou réciproquement) s'effectue suite à une réaction d'affinité entre les deux espèces, permettant la formation d'un complexe que l'on peut mettre en évidence.

Le présent travail de thèse porte sur l'élaboration d'un immunocapteur en vue de la détection et de la quantification de *Legionella pneumophila* dans des échantillons environnementaux (eaux). *Legionella pneumophila* est une bactérie pathogène omniprésente dans les milieux aquatiques artificiels et naturels, et responsable d'une maladie potentiellement grave chez l'Homme, la maladie des légionnaires. Lors de différents stress environnementaux, *Legionella* est susceptible de perdurer dans un état viable mais qui ne permet plus sa croissance sur les milieux de culture connus - à ce jour - pour permettre sa croissance (état VBNC -Viable but nonculturable). Ces formes VBNC ne sont pas détectées

par les techniques en vigueur pour la recherche et le dénombrement des légionelles dans l'environnement par culture (AFNOR T90 431 et ISO 11731).

Les légionelles peuvent être également détectées, dans les échantillons environnementaux grâce à la PCR (AFNOR T90 471 et ISO 12869). Comme nous le verrons plus loin, la PCR présente le désavantage de ne pouvoir distinguer les formes vivantes des formes mortes dans les échantillons testés, l'ADN cible de la détection étant détectable longtemps après la mort cellulaire (y compris lorsqu'il se retrouve libre à l'extérieur de la cellule). La PCR nécessite également un matériel spécialisé et le coût de l'analyse est potentiellement élevé.

Au cours de ce travail, nous nous sommes donc intéressés à des systèmes alternatifs de détection basés sur la fonctionnalisation de surfaces d'oxyde d'indium-étain (ITO) par des monocouches auto-assemblées (SAMs) de silanes, pour l'immobilisation d'un anticorps monoclonal anti-*Legionella* dans l'optique de réaliser des immunocapteurs à impédance électrochimique pour la détection de *Legionella pneumophila*. Ces capteurs sont d'une réalisation relativement simple. Ils sont globalement moins coûteux que la PCR.

Au cours de cette thèse, il a été nécessaire d'évaluer leur spécificité, leur sensibilité (en particulier, s'agissant de la seconde version de capteur développée, si les formes VBNC étaient susceptibles d'être ou non détectées).

Ce manuscrit est subdivisé en trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à la bibliographie. Nous présenterons d'abord des généralités sur *Legionella pneumophila*, et ses différents types physiologiques, ainsi que les différentes techniques permettant sa détection. Ensuite, nous nous attacherons à l'étude des biocapteurs et les principes de détection qui leurs sont associés. Enfin, nous étudierons les méthodes d'immobilisation des biorécepteurs et la caractérisation de transducteur par des méthodes électrochimiques.

Le deuxième chapitre est consacré aux matériels et aux méthodes utilisées. En particulier s'agissant de la fonctionnalisation de surface d'ITO par des SAMs de silanes, la caractérisation des couches de fonctionnalisation et l'immuno-détection de *Legionella pneumophila*. Nous avons aussi étudié la performance de notre immunocapteur sur des échantillons environnementaux.

Dans le dernier chapitre, les résultats de ces études sont présentés et discutés.

Une conclusion générale et des perspectives viennent terminer ce mémoire.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

I. Les légionelles

I.1. Introduction

La pollution microbiologique environnementale peut toucher différents éléments tels que l'air, l'eau ou le sol. Néanmoins, l'eau fait partie des principales sources de propagation d'épidémies bactériennes ou virales. C'est la raison pour laquelle le contrôle de la qualité de l'eau est très important qu'elle soit domestique (eaux destinées à la consommation humaine), de baignade (eaux chaudes sanitaires, eaux minérales naturelles à usage thermal) ou à usage industriel [1].

Aussi bien en France qu'en Tunisie, les ministères chargés de la santé imposent la surveillance de la qualité des eaux et du paramètre *Legionella* dont *Legionella pneumophila* au sein de nombreuses installations. En France, l'arrêté du 1^{er} février 2010 impose le contrôle sanitaire de la qualité de l'eau vis-à-vis des légionelles, au niveau des installations de production, les installations de stockage et les installations de distribution d'eau chaude sanitaire, au moins une fois par an, sur quatre niveaux différents, tels que la sortie de production d'eau chaude sanitaire (ECS), le fond de ballon de production, les points d'usage à risque les plus représentatifs du réseau, et le retour de boucle (retour général). En Tunisie, il n'y a pas de réglementation, mais une note d'invitation à la vigilance en matière hygiène, soumise via l'office national du tourisme tunisien (ONTT), adressée aux établissements touristiques, qui a été diffusée par une circulaire en mai 2013.

Le contrôle de la qualité des eaux, peut s'effectuer grâce à des tests de présence de certains indicateurs de pollution bactériologique. La recherche de ces bio-indicateurs demeure un enjeu de plus en plus important dans le domaine environnemental. Le paramètre *Legionella* dont *Legionella pneumophila* est indiqué pour l'analyse des réseaux d'eaux collectifs. La recherche de ce paramètre est basée, à l'heure actuelle, sur des techniques de détection « classiques » tels que la culture et la PCR [2 ; 3]. La culture, comme la PCR, présentent des avantages et des inconvénients (voir paragraphe I.6.1.). Il est donc pertinent de s'intéresser à d'autres techniques qui pourraient améliorer les conditions de réponse au risque sanitaire imposé par les légionelles et par *Legionella pneumophila* en particulier. Les enjeux économiques et sanitaires nécessitent de s'intéresser aux techniques associant réduction des délais d'analyse, portabilité sur le terrain, coût réduit des dispositifs et pourquoi ayant le

potentiel de permettre une analyse en temps réel des différents écosystèmes notamment anthropiques que colonisent les légionelles.

I.2. Historique

Au cours de la 58^{ème} convention de la légion américaine à Philadelphie, USA en 1976, 182 vétérans (qui fréquentaient l'hôtel Stratford-Bellevue, lieu de la convention) ont été atteints d'une pneumonie atypique, qui s'est avérée mortelle pour 29 d'entre eux [4]. L'étude épidémiologique a révélé la présence d'un organisme pathogène dans l'hôtel. Le système de climatisation de cet hôtel fût mis en cause, la contamination semblant se faire par voie aérienne. L'agent bactérien responsable de cette épidémie a été isolé en 1977 [5] et nommé *Legionella pneumophila* en référence aux légionnaires victimes de cette épidémie. La maladie a, quant à elle, été appelée « maladie des légionnaires » ou légionellose.

Des études rétrospectives, effectuées sur des échantillons isolés antérieurement lors d'épidémies ou de cas isolés de pneumonies et pour lesquels aucune bactérie n'avait pu être clairement identifiée, ont mis en évidence que des cas de légionellose existaient bien avant 1976 (années 1947 à 1959) [6].

I.3. Définition

Les *Legionella* appartiennent à la famille des *Legionellaceae* [7], comportant un seul genre *Legionella* et actuellement, 58 espèces et 70 sérogroupes. Ce sont des bactéries (bacilles) à Gram négatif (leur paroi contient particulièrement certains acides gras insaturés ramifiés), polymorphes, aérobies strictes, non encapsulées, à l'exception de l'espèce *L. longbeachae* qui présente une structure de type capsule par observation au microscope électronique et possède des gènes impliqués dans la production de cette structure [8]. Les légionelles mesurent 0.3 à 0.9 µm de large et 2 à 5 µm de long (des formes filamenteuses existent notamment lorsqu'elles sont repiquées fréquemment sur milieux de culture). Elles ne sporulent pas, et la plupart sont mobiles grâce à leur flagelle polaire ou latéral [9]. La microscopie électronique révèle de multiples pili émanant de la surface [10 ; 11].

Les légionelles ont des besoins particuliers et complexes pour leur croissance, et ne poussent pas sur les milieux de culture usuels. Toutes les espèces sont organotrophes, utilisant des acides aminés (et non pas des hydrates de carbone), comme source d'énergie et de carbone [12 ; 13], et sont auxotrophes vis-à-vis de la L-cystéine et exigeantes en sels de fer pour leur multiplication [13 ; 14]. Elles ne sont pas capables de fermenter le glucose ni de réduire les nitrates. Elles sont uréase-négatives, oxydase-négatives, catalase-positives et

gélatinase-positives, se développent quasiment exclusivement (sur les milieux de culture disponibles à ce jour) sous un pH de 6.8 à 7, en donnant des colonies en 2 à 15 jours, blanches avec reflets bleutés et présentant un aspect typique de « verre fritté ».

Leur paroi est très particulière par rapport à celle des autres bactéries à Gram négatif : elle est en effet très riche en acides gras ramifiés (40 à 90% de l'ensemble des acides gras) habituellement retrouvés chez les bacilles à Gram positif [15]. Chaque espèce de *Legionella* possède un profil caractéristique en acides gras ce qui permet de les différencier (identifier) par chromatographie en phase gazeuse [16] ou liquide [10].

Les légionelles portent des gènes qui rappellent ceux des bactéries thermophiles, ce qui explique leur capacité de survie dans les eaux chaudes. Elles sont naturellement présentes dans les environnements hydriques au sens large, causant une maladie respiratoire grave chez l'Homme, potentiellement mortelle, la légionellose [17]. Cette pathologie sévère se déclare après l'inhalation d'aérosols contenant des légionelles [18]. Ces légionelles colonisent les eaux naturelles et les eaux associées aux systèmes anthropiques notamment les canalisations des tours aéro-réfrigérantes [19], les bains bouillonnants. Leur présence a été montrée y compris dans les eaux souterraines [20]. En effet, plusieurs espèces de *Legionella* y ont été détectées (y compris *L. pneumophila*), suggérant l'existence des conditions compatibles avec leur multiplication ou leur survie. Ces mêmes bactéries prolifèrent à l'intérieur des réseaux d'adduction d'eau dans les canalisations où différents paramètres favorisent leur installation (présence de biofilms,...) [21].

Les maladies causées par les légionelles (environ la moitié des espèces décrites à ce jour a été associée avec une forme clinique) se manifestent sous trois formes :

- La fièvre de Pontiac (voisine de 41°C), qui est une forme bénigne et qui guérit de façon spontanée en 2 à 5 jours, sans signe de pneumonie ;
- La maladie du légionnaire, qui est une forme plus grave et caractéristique d'une pneumonie. Les symptômes sont similaires à d'autres pneumonies causées par d'autres agents bactériens et sont, le plus souvent : fièvre, anorexie, bronchite, muscles douloureux, malaise... La plupart des légionelloses sont dues à l'espèce *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 (90% des cas de légionellose [22 ; 23]), pour le reste ce sont principalement les sérogroupes 4 et 6 [24].
- Des formes extra-pulmonaires rares mais très graves. Dans ce cas le cœur, les reins ou d'autres organes peuvent être touchés [25].

I.4. Virulence

La structure de la paroi joue un rôle important dans la virulence de *Legionella* [26 ; 27].

Certains composants de la paroi, interviennent comme facteurs de virulence et participent au processus infectieux des légionelles :

- La protéine MOMP (« Major Outer Membran Protein ») : C'est une porine liée au peptidoglycane, susceptible de créer des canaux permettant le passage des ions dans la membrane de cellule hôte [28 ; 29]. En outre, cette protéine s'associe aux récepteurs du complément (CR1 et CR3) des surfaces des monocytes humains, facilitant l'attachement de *Legionella* à la cellule hôte [30].
- La protéine Hsp60 (« Heat shock protein », 60 kDa) : Cette protéine, qui est codée par le gène htpB [31], est fabriquée en réponse au choc thermique, choc osmotique, et au peroxyde d'hydrogène (*in vitro*) [31]. Hsp60 intervient dans les interactions protéine-protéine, ce qui facilite l'adhésion et l'intégration des *Legionella* dans les macrophages.
- La protéine Mip (« Macrophage infectivity potentiator », 24 kDa) : C'est une protéine de surface chez *Legionella* qui intervient aux premières étapes de l'infection des cellules hôtes en favorisant vraisemblablement l'attachement [26].

Le lipopolysaccharide (LPS) : il représente le composant important de la paroi de *Legionella*, qui intervient dans l'adhésion de la bactérie à la muqueuse respiratoire [30]. Ce sont les plus importants déterminants immunogéniques qui conditionnent la spécificité de chaque sérotype de *Legionella*. Le LPS possède un caractère très hydrophobe suite à la présence de groupes acétyles dans son architecture, ce qui renforce la virulence des *Legionella*. Cette hydrophobicité facilite la survie de *Legionella* dans les aérosols [32] et alors son transport sur de longues distances depuis la source des aérosols contaminés.

- Les pili de type IV : Ces pili de longueur 0.8 à 1.5 µm, interviennent dans le mécanisme de l'adhésion de la bactérie à la cellule hôte [33 ; 34]. La biosynthèse de ces pili, par *Legionella*, est influencée par la température (biosynthèse plus importante à 30 °C qu'à 37 °C). Ils interviennent aussi lors de la conjugaison (transfert/échange d'ADN chez *L. pneumophila*). [35].
- Les flagelles : Les flagelles interviennent dans le processus infectieux de *Legionella* lors de l'étape d'intégration de la bactérie à l'intérieur de la cellule hôte [36]. Leur biosynthèse est contrôlée par la température (biosynthèse plus importante à 30 °C qu'à

37 °C ou 41 °C). Par contre, la seule absence des flagelles (formes mutées) n'affecte pas la virulence de *Legionella* [37]. Les flagelles facilitent également la mobilité des *Legionella*, et leur rencontre avec les amibes lesquelles constituent des réservoirs dans l'environnement après phagocytose [38].

I.5. Ecologie

Les légionelles sont omniprésentes dans les environnements humides. Elles ont été isolées dans les écosystèmes naturels tels que eaux de surface, rivières, eaux douces (mares, étangs), sédiments humides (sol humide, boues), ou les écosystèmes artificiels tels que les réseaux de distribution d'eau chaude (ballons de stockage, circuit d'eau, robinets, pommeaux de douche, etc...). Elles prolifèrent également dans des installations générant des aérosols comme les tours aéro-réfrigérantes ou toute autre système de climatisation de principe de fonctionnement similaire. Leur présence est problématique dans les établissements recevant du public (tels que les établissements de santé, les hôtels, les établissements thermaux,...) [39 ; 40 ; 41]. Les animaux et les sols non humides ne constituent pas des réservoirs à *Legionella* susceptibles d'être à l'origine d'une contamination humaine [42]. Une transmission inter-humaine a récemment été documentée [43] mais elle a pu avoir lieu dans des conditions très particulières. Il est communément admis qu'il n'existe pas de transmission inter-humaine de la bactérie.

Des études effectuées dans des lieux collectifs [44] ont montré que 37 à 70% des circuits de distribution d'eau chaude étudiés, contenaient des légionelles, à des concentrations comprises entre 50 à 10⁶ UFC/L (unités formant colonies par litre).

Ces chiffres indiquent que la prolifération des *Legionella* dans les circuits d'eau, est une situation relativement courante. Il faut donc être vigilant dans la maintenance des réseaux pour éviter les risques de prolifération des légionelles.

Ces différentes installations d'eau ont pour point commun de combiner les conditions favorables de développement et multiplication des *Legionella* :

- **Caractéristiques propres aux réseaux** : présence de bras mort (eau stagnante), nature des matériaux (zinc, aluminium, fer, chlorure de polyvinyle (PVC)...), pH de l'eau compris entre 5.5 et 8.5 [45 ; 46]. Le dépôt de tartre et de corrosion renforce le développement des légionelles. Ces paramètres sont autant de facteurs favorisant la prolifération de *Legionella* dans les réseaux d'eau domestique [47]. Ces facteurs sont souvent liés à des dysfonctionnements des systèmes de distribution d'eau potable [48].

- **Caractéristique de l'eau** : La présence de *Legionella* est plus marquée dans les eaux minéralisées, avec des hydrogénocarbonates, magnésium, calcium, fer, ... Le cuivre aurait une action inhibitrice [49 ; 50].
- **Température de l'eau** : les sources de contamination par les légionelles les plus souvent incriminées sont des installations où la température d'eau est comprise entre 25 et 42°C [51 ; 52].

Au-delà de cette température, la multiplication se ralentit, mais il faut dépasser une température de 70°C pour détruire les légionelles [11 ; 53]. Inversement, lorsque la température est basse, *Legionella* entre dans une phase de dormance tout en ralentissant ou stoppant sa multiplication mais elle survit [54], ce qui explique qu'on puisse les retrouver dans tous les milieux aquatiques.

- **La présence de biofilms** : Les légionelles survivent dans les biofilms bactériens [55 ; 56]. Des études ont montré leur persistance dans des installations [57] en présence de biofilm. En effet, le biofilm, qui est formé par des sédiments organiques et d'autres micro-organismes, fournit l'habitat et les nutriments nécessaires à la survie voire la croissance des légionelles. Ces biofilms étant résistants aux processus de désinfections, ils assurent alors une protection très élevée pour ces bactéries. Les biofilms se forment particulièrement dans les endroits d'eau stagnant (bras morts de réseaux d'eau froide ou d'eau chaude) ou dans les ballons de stockage (leur présence a d'ailleurs conduit à modifier la conception de ces ballons notamment pour empêcher la présence de gradients de température promoteurs de croissance bactérienne en leur sein).
- **La présence d'autres microorganismes** : les légionelles peuvent coloniser des amibes ou d'autres espèces des protozoaires (en particulier des ciliés) à l'intérieur desquels elles survivent, se multiplient et contaminent le milieu après la lyse de leur hôte [58 ; 59]. Les légionelles peuvent persister dans la même niche écologique en association avec d'autres microorganismes comme par exemple les cyanobactéries. Les légionelles ont créé des stratégies pour s'adapter aux conditions défavorables imposées par les différents environnements dans lesquels elles se trouvent. En particulier, elles sont capables : 1/ d'entrer dans un état de dormance (état dans lequel elles perdent la capacité de se multiplier) et ; 2/ de se multiplier au sein de différentes niches écologiques assurant ainsi leur protection (comme les biofilms et les amibes).

I.5.1. Interaction avec les amibes

L'écologie et la virulence des *Legionella* sont intrinsèquement liées. Les légionelles sont les parasites, d'au moins deux espèces de protozoaires ciliés, dont *Tetrahymena*, et treize espèces d'amibes dont *Echinamoeba sp.*, *Hartmanella sp.*, *Acanthamoeba sp.* ... qui ont été isolées des systèmes d'adduction d'eau contaminés par les légionelles [30 ; 39 ; 60].

Normalement les protozoaires phagocytent les bactéries pour les digérer et les utiliser comme sources de nutriments. A 20°C, les protozoaires phagocytent les *Legionella*, et sont susceptibles de les détruire [61]. Néanmoins, au-delà de 35°C, certaines espèces de légionelles infectent et se multiplient activement à l'intérieur de ces protozoaires en les utilisant comme des réservoirs potentiels engendrant une lyse de ces protozoaires [39 ; 62].

Les légionelles, pour assurer leur survie, pénètrent dans les microorganismes eucaryotes, en particulier les amibes libres. Elles sont ensuite capables de détourner le système de digestion habituellement mis en place par les amibes, puis se multiplient dans des vacuoles de phagocytose dites phagosomes [60]. Après 36 à 48 heures d'infection, le phagosome occupe la quasi-totalité de la cellule hôte et contient un nombre important des légionelles qui vont être rejetées dans l'environnement sous forme de vésicules, ou sous formes libres par lyse de l'amibe [39]. Les légionelles vont ainsi être capables de coloniser de nouveau des biofilms, ou d'infecter des nouvelles amibes ou de contaminer l'Homme.

A l'intérieur des phagosomes, les légionelles sont mobiles et de taille inférieure à celle des formes cultivées sur milieux de culture. Après leur libération dans l'environnement, elles acquièrent des propriétés particulières, elles deviennent plus résistantes aux conditions défavorables (acidité, pression osmotique, températures élevées, manque de nutriments, traitements de désinfection,...) et leur pouvoir infectieux pour les cellules des mammifères devient plus important [39 ; 63 ; 64].

En plus d'augmenter la virulence des légionelles, les amibes peuvent assurer leur protection pour survivre pendant de longues périodes lorsque les conditions sont défavorables (enkystement des amibes) [63 ; 65 ; 66].

L. pneumophila, en particulier, est ainsi capable d'interagir avec les protozoaires ce qui explique sa présence continue dans l'environnement. Sa capacité à infecter divers microorganismes eucaryotes pourrait expliquer que cette espèce soit largement répandue et la plus fréquemment impliquée dans les cas de légionellose chez l'Homme.

I.5.2. Colonisation des biofilms

Les biofilms sont des communautés de microorganismes sessiles qui adhèrent à support inerte ou vivant. Ces microorganismes étant regroupés au sein d'une matrice d'exopolymères [33 ; 67] en contact avec un fluide contaminé.

Cette communauté peut être constituée de bactéries, champignons, protozoaires (tels que les amibes), algues et autres microorganismes procaryotes ou eucaryotes.

Certaines espèces du genre *Legionella*, dont *Legionella bozemanii* et *Legionella pneumophila*, sont capables de former des biofilms monobactériens ou de coloniser des biofilms pluribactériens [30 ; 57 ; 59 ; 68 ; 69]. Ces biofilms peuvent fournir aux légionelles une protection vis-à-vis des « agressions » extérieures, telle qu'une insuffisance en nutriments, ou au cours des processus de désinfection [57 ; 69 ; 70 ; 71]. Ces biofilms sont également le lieu de transferts d'éléments génétiques entre cellules bactériennes et peuvent, dans certaines conditions, permettre à certaines espèces d'acquérir des gènes susceptibles de favoriser leur résistance ou leur virulence.

Les biofilms ne permettent pas toujours la multiplication de bactéries constitutives, mais la présence des amibes telles que par exemple *Hartmanella vermiformis*, *Acanthamoeba castellanii* ou *Acanthamoeba polyphaga* constitue une niche leur permettant d'y arriver [57 ; 68 ; 72]. Récemment, des études ont montré que *Legionella* est capable d'utiliser les cellules bactériennes mortes dans les biofilms comme source de nutriments pour assurer leur multiplication [73].

Les *Legionella* peuvent agir comme espèces pionnières dans l'élaboration des biofilms, même si elles ne constituent jamais une partie prépondérante des espèces présentes [55]. Les biofilms contribuent à sa résistance notamment vis à vis de substances désinfectantes [74] (Figure 1).

Les facteurs influençant l'écologie des *Legionella* doivent être parfaitement connus et ne doivent pas être négligés lors de la prise en charge d'un réseau d'eau colonisé par ces bactéries [39].

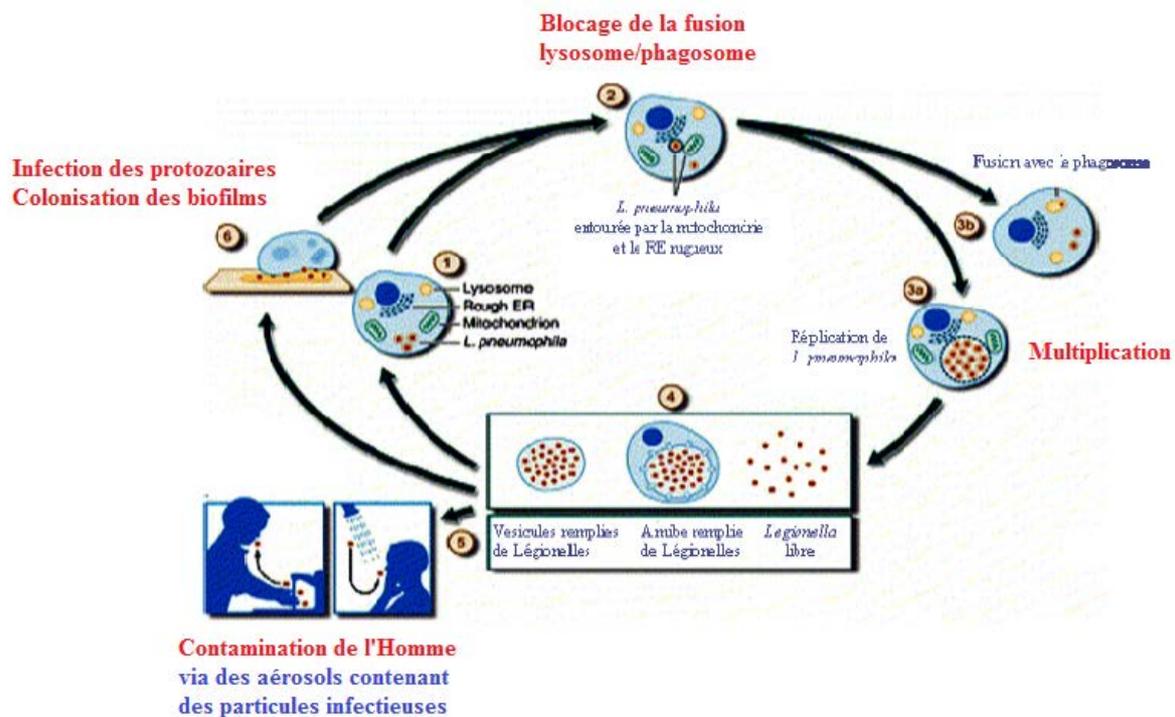


Figure 1 : Cycle de vie de *Legionella pneumophila* [75]

I.6. Les différentes techniques de détection de *Legionella*

L'habitat naturel de *Legionella* est l'eau. Le contrôle des légionelles dans les eaux douces et dans les circuits hydrauliques (dont les réseaux d'eaux chaudes sanitaires - ECS- et les tours aéro-réfrigérantes - TAR -) est d'un enjeu considérable. Leur présence dans les eaux souterraines est encore mal documentée, bien que ce type de ressources soit extrêmement fréquent [76].

I.6.1. Culture

La mise en culture peut être réalisée directement à partir d'échantillons d'eaux contaminées, ou des prélèvements des voies respiratoires chez des patients atteints de légionellose.

I.6.1.1. Echantillons environnementaux

La technique de recherche et de dénombrement des légionelles dont *Legionella pneumophila* à partir d'un échantillon environnemental s'effectue selon la norme AFNOR NF T90-431 ISO11731 « Qualité de l'eau- Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* » de septembre 2003 [77].

Le seuil de détection de cette version (septembre 2003) est de 50 UFC/L. Une nouvelle version de cette norme T90-431 a été proposée en novembre 2014, par l'Agence Française de Normalisation (AFNOR). Une mise à jour a été proposée afin d'aboutir à une diminution du seuil de détection (10 UFC/L pour les eaux propres).

Cette technique fait appel à un milieu sélectif GVPC. Le milieu d'isolement de base - nommé BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) - contient du fer, de la L-cystéine et du charbon [78]. En ajoutant de la glycine, de la vancomycine, de la polymyxine et de la colistine, ce milieu (GVPC) devient un peu plus sélectif pour les légionelles (le développement de certaines espèces de légionelles peut d'ailleurs y être inhibé).

Elle peut être appliquée aux eaux propres (eaux chaudes sanitaires, eaux destinées à la consommation humaine, eaux minérales naturelles à usage thermal ...), et aux eaux sales (eaux industrielles, eaux naturelles...).

Les légionelles ont une croissance assez lente sur de tels milieux de culture en particulier lors de leur primo-isolement. Généralement, les colonies se manifestent microscopiquement après 2 jours d'incubation sur leur milieu GVPC, et sont apparentes macroscopiquement après 3 à 5 jours. Ces colonies ont une forme ronde avec un bord entier peu convexe et brillant, mesurant 1 à 4 mm de diamètre. Les bords des colonies présentent généralement une irisation bleu-vert alors que leur centre est grisâtre avec éclat caractéristique tachetée. Avec une incubation prolongée, le centre de colonie devient blanc crème, et perd souvent une grande partie de son irisation.

I.6.1.2. Echantillons cliniques

Au niveau clinique, le prélèvement recommandé donnant de meilleures chances d'isolement est le lavage broncho-alvéolaire. Un sérum physiologique est instillé dans un territoire alvéolaire, puis le liquide est réaspiré et analysé [79].

Néanmoins, si l'état clinique du patient n'autorise pas ce type de prélèvement, il est possible d'isoler la bactérie à partir d'expectorations ainsi que de biopsies pulmonaires, du liquide pleural, ou d'aspirations trachéales. Les échantillons collectés sont tout d'abord traités à l'acide (pH 2,2) et/ou à température élevée (30 min à 50 °C) auxquels les *Legionella* sont résistantes, de manière à éliminer la flore microbienne présente dans l'échantillon [80 ; 81]. La spécificité de détection, dans ces prélèvements, est liée à l'utilisation de milieux spécifiques d'isolement (tels que le GVPC ou d'autres milieux de composition proche).

La mise en culture reste toujours une technique de référence, mais son inconvénient est sa lenteur (3 et 10 jours pour avoir un résultat visible) et d'une sensibilité variable selon les échantillons et l'expertise du laboratoire qui effectue la mise en culture. De plus, cette technique est incapable de détecter les formes viables mais non cultivables (VBNC).

I.6.2. Mise en évidence d'antigène soluble dans les urines

La détection d'antigène urinaire spécifique de *L. pneumophila* sg 1 a été mise au point en 1979 [82]. Cette méthode de détection, a été tellement utilisée et commercialisée à la fin des années 1990 qu'actuellement, elle constitue la méthode la plus répandue pour détecter les cas de légionellose (96 % des cas en 2009) grâce à un test précoce et rapide. *L. pneumophila* est détectée par l'intermédiaire d'un de ses antigènes que l'on peut retrouver dans les urines des patients [83]. Trois méthodes de détection de l'antigène urinaire, ont été développées avec des sensibilités et des spécificités comparables : (i) la radio-immunologie (l'anticorps secondaire étant radiomarqué), (ii) l'immuno-enzymologie (ELISA : l'anticorps secondaire étant couplé à une enzyme dont l'activité pourra ensuite être détectée, durée de réalisation 4 h) et (iii) l'immuno-chromatographie sur membrane (migration d'anticorps anti-LPS marqués, durée de réalisation 15 min). Les tests basés sur la recherche de *L. pneumophila* sg 1 à partir de l'antigène urinaire, ont une grande spécificité, d'environ 100% [84], mais leur sensibilité varie, entre 70 % et 96 % [84], selon la concentration ou non des urines avant l'analyse. La concentration des urines permet l'augmentation de la sensibilité sans influencer la spécificité. Ces variations de la sensibilité sont associées à différentes causes : (i) les tests disponibles ne permettent que de détecter *L. pneumophila* sg 1 ce qui biaise la recherche d'infections causées par d'autres espèces et sérogroupes de *Legionella* [85] ; (ii) la gravité de la maladie (meilleure détection pour les cas graves) [86]; (iii) l'utilisation d'urines avant ou après concentration (meilleure après concentration des urines) [87 ; 88] ; (iv) le temps d'incubation du test, pour les méthodes immuno-chromatographiques (la prolongation à une heure permet d'augmenter la sensibilité) [89].

Malgré ces variations de sensibilité, les tests urinaires ont l'avantage d'être faciles à appliquer et permettent un diagnostic précoce. En effet, ces tests sont généralement positifs très tôt (après 1 à 3 jours) lors de l'infection et deviennent négatifs en 4 à 6 semaines. Cependant, chez une faible proportion de patients, les antigènes de *L. pneumophila* peuvent persister jusqu'à un an après le début de la maladie [90 ; 91]. Les tests actuels basés sur la recherche d'Ag urinaire sont limités à la détection de l'espèce *L. pneumophila* sg 1 [92]. Pour ce type de test, l'utilisation d'un nouvel antigène (PAL, Peptidoglycan-associated lipoprotein)

pourrait permettre la détection d'autres sérogroupes de l'espèce *L. pneumophila* (sérogroupes 3, 4, 5 et 6), voire d'autres espèces comme *L. anisa*, *L. oakridgensis*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. gormanii*, et *L. sainthelensi* [93 ; 94].

I.6.3. Sérologie et immunofluorescence indirecte

Au milieu de 19^{ème} siècle, George Gabriel Stokes été le premier à découvrir le phénomène de la fluorescence, en excitant une molécule fluorescente par les U.V. [95].

Il y a deux types de fluorescence, l'auto-fluorescence ou dite aussi fluorescence naturelle (comme dans le cas de chlorophylle des cellules végétales et celle de certaines espèces de légionelles), ou la fluorescence résultante de couplage d'un fluorochrome (substance chimique capable d'émettre une lumière suite à une excitation par une lumière à une certaine longueur d'onde).

En biologie, la recherche des anticorps témoin de la présence d'un ou de l'infection par un microorganisme, se fait par une méthode d'immunomarquage, dite immunofluorescence indirecte. Ce phénomène est dû à un couplage d'un fluorochrome à un anticorps.

La méthode de la recherche des anticorps anti-*Legionella*, par immunofluorescence indirecte (IFI ou IFAT : indirect fluorescent antibody test), était largement utilisée avant la commercialisation des tests urinaires en 1999. Ce test qualitatif est basé sur la reconnaissance, dans le prélèvement, d'anticorps anti-LPS de *Legionella* par des anticorps couplés à une protéine fluorescente (fluorophore) au niveau du Fc. Dans ce cas, ce test passe par différentes étapes (Figure 2) :

- Fixation des bactéries : les bactéries spécifiques de l'anticorps recherché (il s'agit d'immunoglobulines de type G qui sont ici recherchées), est fixée par liaisons électrostatique sur un support solide. La chaine polysaccharidique de LPS, et qui est caractéristique pour chaque séro groupe de *L. pneumophila*, porte l'antigénicité O reconnue par l'anticorps spécifique.
- Incubation de l'anticorps monoclonal primaire à détecter (sérum du patient) : l'échantillon à analyser est incubé sur les antigènes fixés.
- Fixation de l'anticorps secondaire de détection : un anticorps secondaire anti-immunoglobuline G est couplé à un fluorochrome. Donc il va reconnaître l'anticorps primaire pour former un immunocomplexe. Ce complexe sera révélé par une fluorescence après lecture par un microscope à fluorescence.

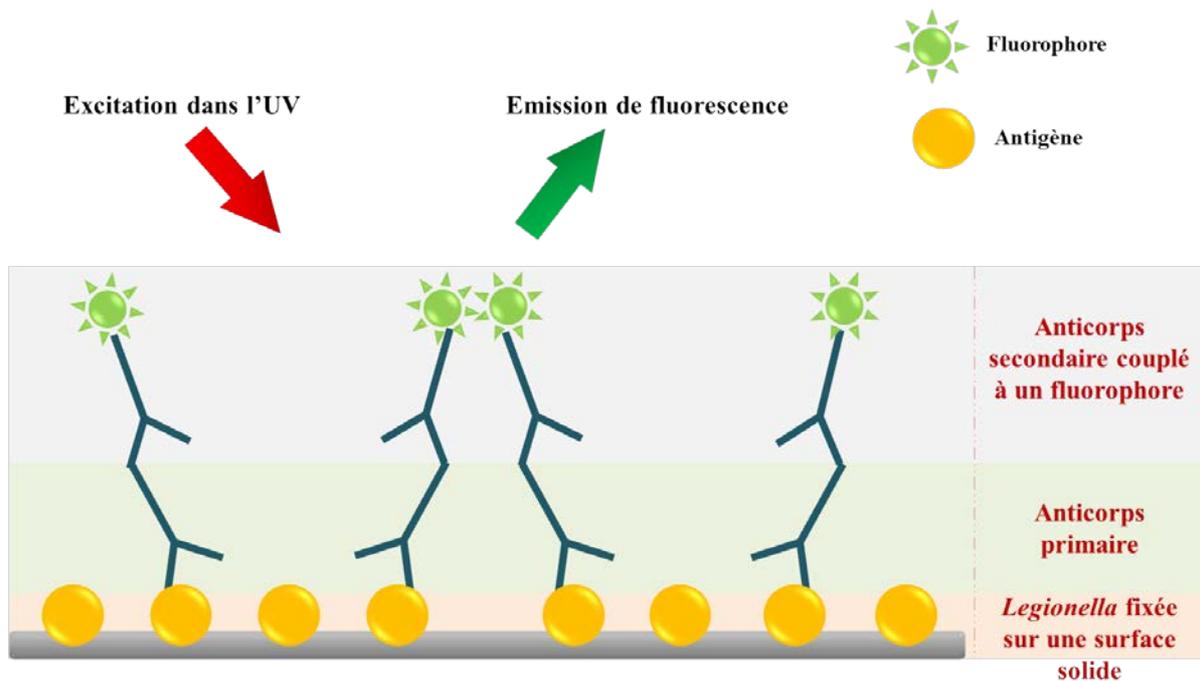


Figure 2 : Principe du test d'immuno-fluorescence indirecte

En cas d'échantillon positif, les anticorps spécifiques, présents dans l'échantillon de sérum, se lient aux antigènes fixés à la phase solide. Dans une seconde étape, les anticorps primaires liés aux antigènes, fixent les anticorps secondaires fluorescents pour être analysés ensuite avec un microscope à fluorescence.

Il est possible aussi de chercher plusieurs anticorps dans le même échantillon, en testant le même sérum contre différents antigènes. La technique n'est pas très rapide et nécessite une certaine expertise pour la lecture (appréciation de potentielles réactions croisées ou de résultats faussement positifs).

Les méthodes sérologiques sont de moins en moins utilisées en France. Le pourcentage des cas de diagnostic de légionellose par ces méthodes étant passé de 58 % en 1997 à 3 % en 2008. Le diagnostic sérologique est un diagnostic rétrospectif. La production d'anticorps étant tardive -2 à 3 semaines après le début d'infection. Par ailleurs, cette technique est contrariée par le fait que de nombreux patients atteints de légionellose gardent des titres anticorps résiduels parfois élevés [96]. Par exemple, chez 20% des patients, ces anticorps sont encore détectables 2 ans après le début de la maladie [97]. Enfin, des réactions antigéniques croisées peuvent se produire entre les différentes espèces du genre *Legionella*, mais également avec d'autres bactéries, tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Coxiella burnetii* (agent de la fièvre

Q), et plus rarement avec *Bacteroides fragilis*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Campylobacter*, *Citrobacter freundii*, *Chlamydia psittaci*, *Rickettsia typhi*, *Proteus vulgaris* et *Haemophilus influenzae* [98 ; 99].

I.6.4. Méthodes moléculaires

I.6.4.1. PCR (Réaction de polymérisation en chaîne)

Cette technique s'effectue, en France, selon la norme AFNOR NF T90-471 « Qualité de l'eau. Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne ».

La PCR est une méthode d'amplification d'ADN *in vitro*, à partir d'un échantillon peu abondant et complexe. Elle permet de cibler une séquence d'ADN particulière dans le génome, dite ADN cible, puis l'amplifier (ou recopier) et la rendre visible voire quantifiable.

En 1985, cette technique a été mise au point par Kary Mullis (prix Nobel de chimie en 1993 pour ces travaux).

La technique de PCR se déroule dans un tube, lui-même placé dans un thermocycleur (appareil programmable conçue de trouver la température voulue pendant le temps programmé). Les éléments utilisés dans la réaction de PCR, qui doivent être ajoutés en excès par rapport à la quantité d'ADN présente, sont l'ADN à amplifier, les amorces (ou oligonucléotides spécifiques de l'ADN cible), l'ADN polymérase, et les 4 désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN.

Dans chaque cycle de PCR, le nombre de séquence d'ADN cible, est dupliqué. En effet, chaque cycle passe par 3 étapes :

- Dénaturation : suite à un chauffage (95 °C), la molécule d'ADN va se dénaturer, pour donner deux simples brins séparés.
- Hybridation : en baissant la température (40 à 65 °C), les amorces vont s'apparier à la séquence complémentaire d'ADN cible. Elles constituent le point de départ pour la polymérisation et l'élongation de brin complémentaire de la molécule d'ADN matrice.
- Elongation : à une température plus élevée (72 °C), l'enzyme d'ADN polymérase intervient pour synthétiser le nouveau brin de l'extrémité 5-prime vers 3-prime. Cette synthèse se fait par fixation successive des désoxyribonucléotides sur leurs bases complémentaires sur le brin d'ADN matrice.

Actuellement, en Europe, la PCR est recommandée pour la détection des *Legionella* dans l'environnement (sous certaines précautions), alors qu'elle n'est pas normalisée comme outils de diagnostic clinique de la maladie de légionellose [100].

Cette technique permet la détection des *Legionella*, sans nécessité de les isoler, quelle que soit l'espèce ou le sérotype. La méthode est rapide, fiable et sensible comme elle permet de détecter des concentrations faibles de bactéries (en tout cas de leur ADN) [101]. Les inconvénients de cette technique sont : 1/ le fait que la technique détecte de l'ADN et n'est donc pas capable de différencier des formes vivantes des formes mortes ou de l'ADN libre ; 2/ la présence possible d'inhibiteurs de la PCR qui peuvent conduire à des résultats faussement négatifs, et ; 3/ le risque d'une contamination de l'échantillon qui peut amener à des résultats faussement positifs.

I.6.4.2. La PCR en temps réel (Norme AFNOR NF T90-471, juin 2015)

D'une façon générale, la technique de la PCR en temps réel, ou la PCR quantitative, permet de détecter et quantifier, au cours du temps, l'ADN d'agents pathogènes dans les échantillons (environnementaux) ou les prélèvements (cliniques), en mesurant le nombre d'amplicons à l'aide d'une fluorescence.

Spécialement dans les échantillons cliniques, sa sensibilité est très dépendante de la qualité des sécrétions respiratoires à analyser [102].

Relativement aux échantillons environnementaux, la PCR en temps réel est une méthode rapide capable de détecter et quantifier les *Legionella* dans tous les types de matrices (issues de circuits de tours aéro-réfrigérées - TAR - ou de circuits d'eau chaude sanitaire - ECS - par exemple) [103].

Cette méthode présente plusieurs avantages tels que la rapidité (résultats en quelques heures), la sensibilité et la quantification.

Cependant, la PCR présente aussi des inconvénients puisqu'elle détecte les *Legionella* présentes dans l'échantillon indépendamment de leur état physiologique (et donc de leur cultivabilité), et ne permet pas d'isoler des souches de *Legionella*, ce qui reste à ce jour nécessaire pour des enquêtes épidémiologiques en particulier. De plus, les résultats obtenus par cette méthode ne peuvent pas être comparables avec ceux de la culture, (absence de corrélation puisque l'on détecte de l'ADN), mais un résultat négatif de la PCR est tout de même prédictif d'un résultat négatif par culture [101 ; 104].

I.6.4.3. La méthode de l'hybridation fluorescente in situ (FISH)

C'est une technique rapide (résultat en 24 à 48h) et semi-quantitative qui permet le suivi et la détection de *L. pneumophila* dans les échantillons d'eau de forte complexité [105]. Elle est basée sur l'affinité moléculaire, en utilisant des sondes d'ADN [106] ou des sondes d'acide nucléiques peptidiques (ANP) fluorescentes [107]. La quantification spécifique de *L. pneumophila* se fait suite à une filtration de l'échantillon d'eau, et l'hybridation de sondes fluorescentes *in situ*.

La méthode FISH présente une gamme de détection comprise entre 2.10^2 à 2.10^7 UFC de *L. pneumophila* par litre lorsqu'une sonde spécifique est utilisée.

I.6.5. La séparation immuno-magnétique (IMS)

L'IMS, ou séparation immuno-magnétique ou immuno-capture, est une technique de plus en plus utilisée pour identifier et quantifier les micro-organismes à partir de l'environnement (eaux de complexité variable), des aliments ...

Depuis 1988 jusqu'à 1994, de nombreux parasites, bactéries ou virus ont été déjà identifiés, quantifiés et caractérisés (il est possible de récupérer les cellules « séparées » après capture) suite à une séparation immuno-magnétique [108].

Cette technique de séparation immuno-magnétique permet la séparation des différentes bactéries de l'échantillon grâce à des billes magnétiques sur lesquelles sont immobilisés des anticorps de spécificité variable. L'antigène recherché va s'accrocher à l'anticorps qui est fixé sur la bille par une réaction spécifique antigène-anticorps par l'intervention des liaisons de faibles énergies (forces de Van Der Waals, forces électrostatiques, liaisons hydrogènes).

Il va y avoir alors formation d'un complexe « (bille magnétique-anticorps)-antigène ». Ce complexe sera retenu grâce à un aimant, puis récupéré et séparé des autres constituants présents dans l'échantillon d'eau complexe.

L'utilisation de cette technique IMS présente plusieurs avantages parmi lesquels la possibilité d'éliminer les inhibiteurs des enzymes d'amplification de la PCR. Plusieurs travaux de recherche ont utilisé l'IMS en association avec la PCR ou la cytométrie en flux pour la détection et l'identification de certaines bactéries [109 ; 110 ; 111]. D'autres travaux ont associé l'IMS à la culture sur milieu sélectif, pour la détection de *L. pneumophila* sg1. Cette technique élimine les interférences en culture avec la microflore hétérotrophe

susceptible de se développer plus vite que les légionelles même sur les milieux de culture *ad hoc* [112].

Différents paramètres peuvent affecter l'utilisation de l'IMS et sa sensibilité. Dans l'environnement, les protéines de surface ou épitopes (cibles des anticorps de détection) de *Legionella* pourraient être dénaturées, altérées ou masquées empêchant leur reconnaissance par l'anticorps. Dans le milieu naturel, en réponse aux différents stress, les parois des *Legionella*, sont susceptibles de subir des modifications, contrariant alors l'accessibilité à des épitopes cibles.

I.7. Contrôle de *Legionella pneumophila* dans l'environnement

Afin de prévenir la colonisation des réseaux d'eau (TAR, circuit de refroidissement ...) par *L. pneumophila*, des traitements de désinfection sont recommandés par la direction générale de la santé en France (DGS) [113] tels que le choc thermique et le choc chloré.

D'après la norme AFNOR NF T90-431, pour contrôler la présence de *Legionella*, un niveau d'alerte été déterminé dans les TAR (de 10^3 à 10^5 UFC/L) et les réseaux d'ECS (soit 250 UFC/L si l'eau est distribuée à des patients à risque, 10^4 UFC/L dans les autres situations) au niveau des établissements de santé et des bâtiments recevant du public. Au-delà de cette concentration, un traitement de désinfection est obligatoire. Cependant, si le niveau d'alerte dépasse 10^5 UFC/L, une fermeture immédiate des installations est nécessaire, pour un nettoyage et une désinfection.

I.7.1. Traitement thermique

La méthode de traitement thermique est basée sur l'élévation de la température d'eau à l'intérieur des réseaux d'eau aux points d'usage, à 70°C pendant 30 min [114]. Cette technique n'est pas forcément facile à réaliser (dimensionnement des chaudières), et des traitements thermiques répétés peuvent favoriser une corrosion des canalisations, permettant l'application des dépôts de calcaire qui peuvent faciliter l'immobilisation de biofilm [115]. Le traitement thermique présente également des risques à l'usage lorsqu'il est appliqué à des établissements recevant du public (hôpitaux) du fait du danger de brûlure des personnes exposées à l'eau (soignants et patients).

I.7.2. Traitement par le dioxyde de chlore ClO₂

Le dioxyde de chlore (ClO₂) est de plus en plus utilisé comme agent désinfectant. C'est un gaz synthétique à odeur irritante. A -59°C, le ClO₂ se transforme en liquide de couleur rougeâtre. Tandis qu'à 11°C, il se convertit en gaz [116].

Le ClO₂ est un biocide oxydant qui agit sur le métabolisme bactérien. Il attaque directement l'ARN et les acides aminés (tels que la cystéine, l'histidine, la proline, l'hydroxyproline, la tyrosine et le tryptophane) des bactéries, ce qui empêche la production des protéines et des acides gras, et par la suite, une inhibition de transport des nutriments à travers leur paroi cellulaire.

Le ClO₂ est utilisé en tant que désinfectant en particulier pour les tours de refroidissement. Son efficacité est moins dépendante du pH que d'autres agents désinfectants chlorés (efficacité à un pH compris entre 5 à 10). En effet, dans son état gazeux, le chlore est totalement soluble dans l'eau :



- A pH < 5 : le chlore est sous sa forme Cl₂
- A 5 < pH < 6 : l'espèce le plus dominant étant le HClO (environ 90%) qui a un effet germicide
- A pH > 8.5 : l'espèce de chlore présent dans l'eau est le ClO⁻ [117].

Une stratégie de désinfection basée sur l'utilisation de dioxyde de chlore implique son injection en faible dose (1 mg/L) [118] pendant 1 h [119]. Ces faibles concentrations ont un effet moins corrosif pour les canalisations (et ne causent pas d'effets indésirables sur le goût de l'eau), alors que des concentrations plus élevées présentent un risque pour le consommateur (sous produits cancérigènes) et pour les tuyaux des circuits (corrosion).

Les différents agents désinfectants employés contre les légionelles dans les réseaux restent peu efficaces contre les formes fixées à l'intérieur des biofilms. Dans ces conditions, *L. pneumophila* tolère des concentrations élevées de chlore jusqu'à 3 mg/L [120].

Les amibes sont naturellement résistantes aux désinfectants [123]. A l'intérieur des amibes, notamment au sein des formes enkystées, *L. pneumophila* tolère jusqu'à 50 mg/L [125].

L'efficacité de nombreuses techniques et agents de désinfection pour détruire les *L. pneumophila* dans les écosystèmes aquatiques anthropiques est incertaine, voire hasardeuse. Des travaux ont montré qu'après certains traitements de désinfection, les *L. pneumophila* ne sont plus cultivables, mais d'autres formes vivantes, qui résistent lors de traitements, mais qui ne sont pas capables de se multiplier sur le milieu sélectif persistent. Ce sont les formes viables mais non cultivables (VBNC) de *L. pneumophila* [41 ; 119].

I.8. Les formes viables mais non cultivables de *L. pneumophila* (VBNC)

En 1982, la notion de "Viable mais Non Cultivable" (VBNC) a été décrite pour la première fois, par l'équipe de Rita Colwell. Il a été montré que des cellules de *Vibrio cholera* et d'*Escherichia coli* étaient encore vivantes, alors qu'elles étaient incapables de pousser sur un milieu de culture gélosé [123].

Les bactéries VBNC sont des bactéries incapables de se multiplier sur milieux gélosés, mais qui sont toujours actives métaboliquement. Cet état métabolique a été considéré comme une stratégie de résistance aux conditions environnementales défavorables [124] pour les bactéries qui ne sporulent pas.

I.8.1. Définition de l'état VBNC

Différentes conditions environnementales défavorables peuvent provoquer le passage des bactéries d'une forme viable et cultivable à la forme VBNC, telles que la température [125 ; 126 ; 127], la carence en nutriments [128], la pression osmotique [139 ; 130], le taux d'oxygène [131]...

I.8.2. Modifications morphologiques et physiologiques

Les bactéries à l'état VBNC diffèrent des formes cultivables en plusieurs points : taille, structure membranaire, synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et de l'ATP.

Concernant la production d'énergie, des études ont montré que certaines bactéries maintiennent la synthèse de l'ATP après leur passage à l'état VBNC [132 ; 133].

En ce qui concerne la morphologie, pour la plupart des bactéries, les formes VBNC sont de taille inférieure aux formes viables et cultivables [134 ; 135].

La surface cellulaire des formes VBNC subit des modifications dans sa composition en acides gras et par la suite une modification de sa fluidité membranaire [136], ainsi que des modifications de sa composition en protéines [137] et en peptidoglycane [138].

D'autres études du protéome total, ont montré que les formes VBNC n'arrêtent pas la synthèse des protéines [139 ; 140], et permettent même l'apparition d'autres protéines (vraisemblablement des protéines d'adaptation) qui ne sont pas exprimées chez les formes viables et cultivables [140 ; 141].

En 1991, Nilsson et al. ont étudié le niveau de synthèse d'ADN et d'ARN chez des bactéries VBNC. Ils ont constaté une diminution de production de l'ADN et de l'ARN chez les formes VBNC par rapport aux formes viables et cultivables [142]. Tandis que d'autres études ont montré que certaines bactéries en état VBNC peuvent maintenir les concentrations normales d'ADN tout en diminuant les concentrations d'ARN [143].

I.8.3. La virulence

Il est probable que de nombreux microorganismes (pour ne pas dire tous en dehors des sporulales qui disposent de leur propre moyen d'adaptation) soient capables de passer à l'état VBNC y compris des bactéries pathogènes. Certains travaux montrent que ces formes VBNC expriment (par rapport à ceux exprimés à l'état viable cultivable) de nombreux gènes responsables de la régulation de l'activité métabolique [144 ; 145] ainsi que des antigènes spécifiques de certaines bactéries [146].

Des gènes codant pour des facteurs de virulence ont également été identifiés chez des bactéries à l'état VBNC [147 ; 148], indiquant l'expression continue (et pourquoi pas augmentée dans certains cas) d'épitopes exprimés au niveau de la paroi bactérienne ; épitopes ayant un rôle dans la virulence de ces formes VBNC [138].

Au-delà des études de l'expression des gènes, différents travaux ont étudié la virulence de ces formes VBNC en les testant contre des cellules cibles et en évaluant leur cytotoxicité ou leur capacité d'induire des réponses cellulaires de type cytokiniques au sein des cellules cibles exposées [149 ; 150 ; 151].

I.8.4. La ressuscitation

La notion de ressuscitation a fait l'objet de divers travaux [152 ; 153 ; 154 ; 155], car elle est potentiellement controversée ; certains pensent que la reprise de caractère cultivable est liée à la présence de quelques microorganismes cultivables au sein d'une population majoritairement sous forme VBNC.

Pour certaines bactéries, il suffit d'éliminer le stress environnemental, pour que la bactérie puisse sortir de l'état VBNC et retrouver son caractère cultivable [149]. Cependant,

pour d'autres espèces de bactéries pathogènes, une interaction préalable avec certaines molécules ou cellules est nécessaire afin de retrouver leur caractère cultivable. C'est le cas des VBNC de *Legionella pneumophila* devant être injectées dans l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* laquelle permet leur ressuscitation [156].

I.8.5. La détection

Différentes techniques ont été employées pour détecter les formes VBNC [157 ; 158 ; 159].

Concernant les formes VBNC de *L. pneumophila*, la cytométrie en flux, basée sur l'utilisation de marqueurs de viabilité (intégrité membranaire pour l'essentiel mais pas exclusivement), a fait l'objet de nombreux travaux s'agissant de les dénombrer [41 ; 114 ; 119 ; 160 ; 161 ; 162].

I.8.5.1. Cytométrie en flux (FCA)

En 1934, Moldavan a élaboré le premier cytomètre en flux pour quantifier les globules rouges en les faisant passer dans un fin capillaire associé à un capteur photoélectrique.

La cytométrie en flux est une technique d'analyse quantitative et qualitative des particules isolées en suspension (cellules, bactéries ...) qui passent une à une devant une source lumineuse (faisceau laser) entraînées par un flux liquide.

➤ Principe :

L'échantillon cellulaire est absorbé puis injecté au centre de jet de mesure par une buse de diamètre entre 50 et 100 μm . Un flux liquide, qui a la même densité de liquide de l'échantillon, entraîne les cellules, une par une, avec une pression bien déterminée, devant une source d'excitation lumineuse (faisceau laser). La cytométrie en flux consiste alors à mesurer les signaux optiques émis par ces cellules coupant le faisceau laser. Les signaux analysés dépendent essentiellement :

- ✓ Des propriétés optiques intrinsèques de cellules telles que le phénomène de la diffusion lumineuse lié à la dimension des particules analysées, la structure interne ainsi que l'auto-fluorescence chez certaines cellules végétales ou les phytoplanctons...
- ✓ Des propriétés optiques résultantes de la fluorescence suite à un marquage spécifique.

Le marquage se fait par des molécules spécifiques, les fluorochromes, caractérisant la structure ou la fonction cellulaire, capables d'émettre une fluorescence suite à leur excitation.

Le faisceau lumineux excite les fluorochromes à une longueur d'onde avoisinante de leur maximum d'absorption. En réponse de l'excitation, à l'aide des miroirs dichroïques et des filtres, les longueurs d'ondes réfléchies révèlent des informations sur les propriétés cellulaires :

- ✓ Lumière diffractée à 90° ou dans l'axe du laser (taille et surface cellulaire) ;
- ✓ Lumière réfléchi et réfractée (complexité cellulaire) ;
- ✓ Fluorescence (immuno-phénotypage, viabilité cellulaire en molécules de surfaces, protéines intracellulaires).

Les lumières résultantes sont recueillies et converties en un signal électrique à l'aide d'une photodiode ou d'un photomultiplicateur.

Les résultats, qui sont traités par un système informatique, s'affichent sous forme d'histogrammes présentant l'intensité des deux signaux simultanément. Les cellules sont répertoriées selon les paramètres étudiés, et sont converties chacune en « événement électrique » lié à plusieurs coordonnées (structure, taille, fluorescence ...). L'ensemble de ces événements constituent des « cytogrammes ». En microbiologie, ces paramètres sont exprimés en pourcentages, évaluant des sous-populations cellulaires. Dans ce domaine, la technique de cytométrie en flux s'intéresse à la détermination de viabilité cellulaire. Pour les cellules viables, les conditions extracellulaires peuvent affecter l'activité métabolique des cellules. En effet, dans les cellules intactes, l'intégrité membranaire est souvent détectable, alors que dans les cellules mortes l'intégrité de membrane cellulaire est perdue, mais l'information génétique (l'ADN) est toujours présente [163].

La technique de marquage par des fluorochromes utilise ces molécules comme des sondes caractérisant une variété de fonctions cellulaires [164]. De ce fait, il est important de bien choisir le fluorochrome utilisé pour le marquage. Ces molécules sont de nature chimique et de tailles diverses ; certaines d'entre eux sont assez petites pour être couplées à d'autres molécules (comme pour les immunoglobulines marquées par un fluorochrome), et d'autres ne peuvent être fluorescentes que dans certains cas (comme pour les marqueurs fluorescents vitaux, qui ne peuvent être fluorescents que dans le cas de présence de l'ADN). Cependant, le fluorochrome choisi doit respecter, et sans affecter, les fonctions cellulaires.

Trois classes de fluorochromes peuvent être utilisées pour déterminer la viabilité cellulaire :

- ✓ Fluorochrome à intégrité membranaire : L'intégrité membranaire est un indicateur de dommage ou de mort cellulaire. La mesure de cette intégrité se réalise par les fluorochromes d'ADN. La fixation de ces fluorochromes indique une perte irréversible d'intégrité membranaire, et alors, ils se fixent à la molécule d'ADN en produisant une fluorescence [164 ; 165]. Les fluorochromes les plus utilisés dans la mesure de l'intégrité de la membrane cellulaire sont la série des SYTO X [166 ; 167] et l'iodure de propidium (PI) [168 ; 169 ; 170 ; 171 ; 172]. Le PI (Figure 3) est le plus souvent choisi pour mesurer l'intégrité membranaire. La longueur d'onde de son excitation est de 536 nm, et celle d'émission est de 620 nm [164 ; 173].

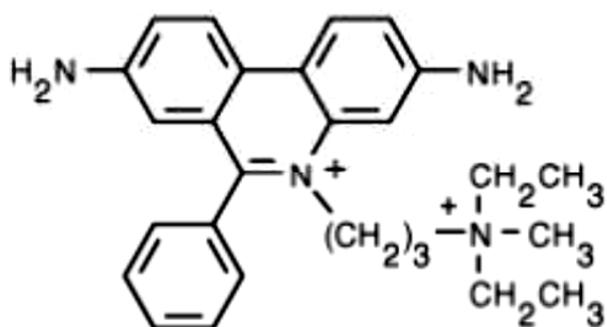


Figure 3 : Structure chimique de molécule de PI

- ✓ Fluorochrome à potentiel membranaire : A travers la membrane cellulaire, il existe des différences de potentiel électrique qui sont dues au fonctionnement des pompes chimio-osmotiques (K^+ , Na^+ et Cl^-) ainsi que les concentrations des ions $NaCl$. Le potentiel transmembranaire constitue un paramètre indispensable pour la physiologie cellulaire. Il intervient dans la production de l'ATP, le transport du nutriment, l'autolyse et la résistance à des pH faibles. La dépolarisation des cellules résulte de la réduction du potentiel membranaire à zéro, à cause de dommage de l'intégrité de la membrane cellulaire, ou à cause de l'élimination des protons à travers la membrane cellulaire [174]. En effet, pour mesurer le potentiel membranaire, différents fluorochromes sont utilisés comme les cyanines et les oxonols, qui sont considérés comme des fluorochromes à réponse à la fois rapide (réaction en microsecondes aux changements de potentiel membranaire) ou lente (réaction en quelques secondes aux changements de potentiel membranaire) [175]. Les oxonols sont considérés comme des fluorochromes lipophiles anioniques, qui se condensent dans les cellules à

potentiel membranaire réduit, en se liant aux composants riches en lipides. Le marquage par ce fluorochrome est dû à la présence des facteurs dépolarisants pour les cellules (exemple des bactéries lactiques viables et cultivables) [176].

- ✓ Fluorochrome à activités métaboliques : Cette classe des fluorochromes est utilisée souvent en biologie cellulaire. Ce sont des marqueurs de viabilité positive utilisés dans les techniques à double marquage avec l'iodure de propidium [177] ou seuls [176 ; 178 ; 179]. A titre d'exemple, la fluorescéine di-acétate (FDA) subit un clivage par des estérases intracellulaires, donnant un produit fluorescent, la fluorescéine, qui en conditions idéales ne peut être retenue que par les cellules vivantes, et donc ne permet pas le marquage des cellules mortes à membranes perméabilisées, qui ne présentent pas l'activité enzymatique [179].

Cette technique permet des analyses quantitatives et multiparamétriques. Elle est sensible et rapide.

Plusieurs travaux ont étudié les formes physiologiques de *L. pneumophila* dans des échantillons environnementaux issus de réseaux d'eau chaude sanitaire par la technique de la cytométrie en flux (FCA). Ils ont associé la FCA à la culture sur milieu sélectif [41 ; 114 ; 119 ; 180]. Ils ont montré notamment, qu'après application de traitements de désinfection dans des réseaux d'eau, les *Legionella* ne sont pas totalement détruites, et que des formes viables mais non cultivables (VBNC) résistantes perdurent (sont soit sélectionnées si pré-existantes ou que certaines formes VBNC sont spécifiquement générées en réponse au traitement de désinfection employé).

1.8.5.2. Co-culture sur amibes *Acanthamoeba polyphaga*

Les amibes sont des micro-organismes unicellulaires eucaryotes. Elles sont caractérisées par un corps déformable, avec des pseudopodes (des prolongements de formes changeantes) assurant leur mobilité sur un support, ainsi que la capture de leurs proies par phagocytose. Leur habitat naturel est les eaux et les sols humides. Elles peuvent être à l'origine de différentes pathologies.

On peut classer les amibes, en fonction de leur habitat, en deux catégories :

- ✓ Les amibes parasites : leur survie nécessite généralement un hôte (Homme ou animaux), en déclenchant des troubles ou une pathologie chez leur hôte.

- ✓ Les amibes libres ou telluriques : elles assurent leur existence autonome dans leur habitat naturel, indépendamment de tout hôte. Mais certaines amibes sont capables d'amphizoïdie, qui signifie qu'elles peuvent être libres dans leur habitat extérieur, ou parasites chez l'hôte en y provoquant une pathologie généralement grave (cérébrale, cutanée, oculaire, sinusienne, auditive ...).

Acanthamoeba polyphaga a été la première espèce isolée en 1913 par Puschkarew. Ces amibes sont couramment trouvées dans l'environnement, au sein de circuits de chauffage et climatisation, dans les piscines, les lacs ... [181]. La présence des amibes *Acanthamoeba* spp dans les réseaux d'eau, est influencée par plusieurs facteurs, tels que (i) la température, elles tolèrent l'élévation des températures jusqu'à 35°C à 45°C, (ii) et la présence de proies. Elles peuvent être présentes en trophozoïtes (formes métaboliquement actives) ou en kystes (formes dormantes suite à un stress environnemental), et elles se nourrissent de bactéries, d'algues et de levures [181].

Dans l'environnement, *Acanthamoeba polyphaga* forme un réservoir pour *L. pneumophila*, en pouvant assurer au moins temporairement leur protection, et on parle alors d'endosymbiose [58 ; 182]. Cette relation a été montrée en premier temps par Rowbotham en 1980 [183].

Ces amibes ont donc un rôle important dans l'écologie des légionelles, car elles peuvent protéger les *Legionella* contre différents stress tels que des désinfectants (elles assurent une protection élevée pour *L. pneumophila* lors d'un traitement au chlore de réseaux d'eau jusqu'à 50 mg/L) [156].

1.8.5.2.1. Attachement et phagocytose

En 1998, Abu Kwaik et al. ont montré que certaines molécules peuvent être impliquées dans l'interaction entre *L. pneumophila* et l'amibe *H. vermiformis*. Cette interaction se fait initialement entre un pili bactérien, de type IV ou CAP, et une lectine amibienne (de 170 kDa). Cette interaction peut être inhibée en cas de présence des sucres galactose/N-acétylgalactosamine [39].

La même année, Harb et al. ont montré que le mécanisme d'attachement de la bactérie est différent d'une espèce d'amibe à une autre. En fait, ils ont trouvé que ces sucres sont sans effet sur l'interaction entre *L. pneumophila* et *Acanthamoeba polyphaga* suggérant la présence d'autres récepteurs impliqués dans l'interaction entre *L. pneumophila* et ces amibes [184].

Les mécanismes de transduction de signal d'attachement de *L. pneumophila* sur l'amibe ont été décrits également par l'équipe d'Abu Kwaik (en 1998). La reconnaissance de *L. pneumophila* par le récepteur Galactose/N-acétylgalactosamine (Gal/GalNAc : lectine de 170 kDa) [185] de *H. vermiformis* déclenche l'envoi d'un signal à l'intérieur de l'amibe, qui se manifeste par la déphosphorylation de la tyrosine de ce récepteur ainsi que d'autres protéines, ce qui perturbe la structure du cytosquelette amibien, et facilite alors l'entrée de *L. pneumophila* par endocytose, accompagnée d'une invagination de la membrane plasmique [186]. Une autre stratégie de phagocytose a été décrite chez *A. castellanii* et *H. vermiformis*, c'est le « coiling phagocytosis » ou enroulement de cytoplasme autour de bactérie [60 ; 186].

I.8.5.2.2. Adaptation de phagosome et évitement de protéolyse

Généralement, après son internalisation dans sa cellule hôte, le phagosome contenant les bactéries, est entouré initialement par des vésicules, des mitochondries et du réticulum endoplasmique rugueux (RER) [187]. La capacité de *L. pneumophila* à survivre ainsi que se répliquer à l'intérieur des amibes, dépend de son pouvoir à détourner la « machinerie » cellulaire de ces amibes [188].

Tilney et al. ont décrit un mécanisme en 4 phases pour comprendre la survie de *L. pneumophila* dans le phagosome (mécanisme qui n'est pas forcément extrapolable à toutes les souches de *L. pneumophila* ni à d'autres espèces de *Legionella*) [189]. D'abord, *L. pneumophila* empêche le phénomène de la fusion des lysosomes avec le phagosome. Par la suite, les vésicules de RER s'attachent à la membrane du phagosome. Et finalement, des ribosomes s'attachent à la surface de ce phagosome.

En effet, *L. pneumophila* induit ces modifications à la membrane de son phagosome, pour mimer la membrane de RER, modifiant ainsi le processus cellulaire normal pour se protéger de la protéolyse. Tous les phénomènes moléculaires sont induits par l'intermédiaire de système de sécrétion de type IV Dot/Icm de *Legionella*.

I.8.5.2.3. Réplication intracellulaire

Une fois à l'intérieur de phagosome modifié, la réplication des bactéries commence. Le retardement de fusion lysosome/phagosome permet à *L. pneumophila* de s'adapter à l'environnement lysosomal. En effet, Swanson et Hammer ont montré qu'après 18 heures d'infection, 50 % des phagosomes contiennent la cathepsine D (enzyme lysosomale), et 70 % contiennent de la glycoprotéine de la membrane lysosomale LAMP-1. D'après ces auteurs, *L. pneumophila* s'adapte à ces conditions difficiles mais riches, pour se répliquer, jusqu'à ce

qu'elles épuisent les réserves locales (acides aminés). A ce stade, *L. pneumophila* exprime des facteurs de virulence, l'aidant à s'échapper de son hôte, pour infecter ensuite une nouvelle cellule hôte [190].

I.8.5.2.4. Echappement de la cellule hôte

En 2000, Harb et al. ont montré que la bactérie peut induire l'apoptose des cellules macrophagiques humaines par la formation des pores au niveau de leur membrane cellulaire [191].

Chez les amibes infectées, le phénomène d'apoptose n'ayant pas été décrit [192]. Le modèle d'échappement de *Legionella* se présenterait en 3 phases : (i) après la phase exponentielle de croissance bactérienne, des pores d'évasion sont créés au niveau de la membrane du phagosome, provoquant sa destruction ; (ii) les *L. pneumophila* sont ainsi libérées dans le cytoplasme et ; (iii) des pores cytolytiques se forment, induisant la destruction de membrane plasmique, et alors la lyse cellulaire.

Après la sortie des *Legionella*, des vésicules de taille de 2 à 6 µm contenant de nombreuses bactéries, sont produites par les amibes infectées [182 ; 193 ; 194 ; 195]. Ces vésicules expulsées assurent une protection pour les *Legionella* [194].

Acanthamoeba polyphaga joue aussi un rôle important dans la ressuscitation des formes VBNC de *L. pneumophila*, qui se traduit par la réapparition des formes cultivables [156]. Ces résultats ont été confirmés par d'autres études qui ont montré la ressuscitation des formes VBNC lors d'une co-culture sur amibes après un traitement au chlore [119] ainsi qu'après un traitement thermique [41].

I.9. Etat de l'art des biocapteurs à *Legionella*

Répondant à des nécessités de diagnostic ou d'analyse d'échantillons issus de l'environnement, plusieurs études ont porté sur l'élaboration de biocapteurs pour l'identification et la détection de *Legionella* en utilisant différents biorécepteurs et différents systèmes d'analyse.

Selon la bibliographie, deux types de biocapteurs à *Legionella* ont été développés. Selon le type de biorécepteur utilisé, on distingue les biopuces à ADN et les immunocapteurs.

Les biopuces : ce sont des biocapteurs à simple brin où un acide nucléique est utilisé en tant que biorécepteur (détection des acides nucléiques de *Legionella* présents dans le milieu à analyser). Les limites de détection sont assez faibles (voir tableau ci-dessous). Lee Ching Ng

et Chee-Seng Toh ont montré par exemple une limite de détection de $2.3 \cdot 10^{-14}$ M d'ADN de *Legionella* [196]. Si ces biopuces sont capables de détecter tous les ADN de *Legionella* présents dans le milieu, elles ne permettent pas de corrélérer ces concentrations d'ADN avec des concentrations en formes vivantes (tout comme la PCR) ce qui rend leur utilisation relativement limitée par rapport à la PCR.

Tableau 1: Etat de l'art des biopuces pour la détection de *Legionella pneumophila*

| Article | Micro-organisme cible | Matrice | Biorécepteur | Système de détection | Limite de détection |
|---|---|---|----------------|---|---|
| Electrochemically amplified molecular beacon biosensor for ultrasensitive DNA sequence-specific detection of <i>Legionella</i> sp. [196] | <i>Legionella</i> sp et <i>Legionella pneumophila</i> | électrode d'or | Séquence d'ADN | mesures électrochimiques | $2.3 \cdot 10^{-14}$ M d'ADN |
| Electrochemical nanoporous alumina membrane-based label-free DNA biosensor for the detection of <i>Legionella</i> sp. [197] | <i>Legionella</i> sp et <i>Legionella pneumophila</i> | électrode en platine | Brin d'ADN | spectroscopie d'impédance électrochimique | $3.1 \cdot 10^{-13}$ M d'ADN |
| Investigation of plasma-functionalized multiwalled carbon nanotube film and its application of DNA sensor for <i>Legionella pneumophila</i> detection. [198] | <i>Legionella pneumophila</i> | électrode en platine | Brin d'ADN | spectroscopie d'impédance électrochimique | 10^{-11} M d'ADN |
| Genosensor for detection of four pneumoniae bacteria using gold nanostructured screen-printed carbon electrodes as transducers. [199] | <i>Legionella pneumophila</i> | électrode sérigraphiée | brin d'ADN | mesures électrochimiques | $5 \cdot 10^{-12}$ M d'ADN |
| Electrochemical Characterization of O ₂ plasma functionalized multi-walled carbon nanotube electrode for <i>Legionella pneumophila</i> DNA sensor. [200] | <i>Legionella pneumophila</i> | Plasma d'oxygène fonctionnalisé par des nanotubes de carbones | Brin d'ADN | mesures électrochimiques | 10^{-11} M d'ADN |
| PCR-coupled electrochemical sensing of <i>Legionella pneumophila</i> [201] | <i>Legionella pneumophila</i> | électrode en or | brin d'ADN | PCR couplées aux mesures électrochimiques | 10^2 génomes de <i>Legionella pneumophila</i> |
| Stem-Loop DNA Probes for the voltammetric determination of <i>Legionella pneumophila</i> on disposable screen-printed gold electrodes. [202] | <i>Legionella pneumophila</i> | électrode en or sérigraphiée | brin d'ADN | mesures électrochimiques | $9.6 \cdot 10^9$ copies d'ADN |

Les immunocapteurs : au niveau de ces biocapteurs, une réaction d'affinité aura lieu entre des anticorps (biorécepteurs) et des antigènes de *Legionella*. Par exemple, Park et al. ont élaboré un immunocapteur pour détecter une très faible concentration en antigènes de *Legionella* (10^{-12} g/mL d'antigène) [203]. De telles concentrations en antigène doivent trouver une équivalence en concentration de bactéries (UFC/L ou UFC/mL). Il reste difficile d'établir une équivalence sachant que la concentration en antigènes détectée n'est pas strictement corrélée à la concentration des bactéries présentes dans un échantillon donné du fait du nombre d'épitopes (antigènes) qu'est susceptible de porter chaque bactérie sur sa surface. Il est nécessaire pour définir une telle équivalence, pour chaque « système » anticorps-antigènes, d'établir des courbes d'équivalence (échantillons artificiels). Les systèmes de détection par immunocapteur sont limités par la faible disponibilité d'anticorps de spécificité remarquable (notamment anticorps monoclonaux).

Lin et al. ont ainsi montré une limite de détection de 10^4 UFC/L par résonance plasmonique de surface [204]. De telles limites de détection restent encore trop élevées si l'on considère les niveaux d'alerte recommandés par les réglementations (voir paragraphe I.7.).

Tableau 2: Etat de l'art des immunocapteurs pour la détection de *Legionella pneumophila*

| Article | Micro-organisme cible | Matrice | Biorécepteur | Système de détection | Limite de détection |
|--|------------------------------------|--|--------------|---|---|
| ZnO nanorod matrix based electrochemical immunosensors for sensitivity enhanced detection of <i>Legionella pneumophila</i> . [203] | <i>Legionella pneumophila</i> | électrode d'or | Anticorps | mesures électrochimiques | 10 ⁻¹² g/mL d'antigène |
| Development and application of side-polished fiber immunosensor based on surface plasmon resonance for the detection of <i>Legionella pneumophila</i> with halogens light and 850 nm-LED [204] | <i>Legionella pneumophila</i> | fibre optique couche d'or | Anticorps | résonance de plasmon et spectroscopie | 10 ⁴ UFC.L ⁻¹ |
| Immunosensor for detection of <i>Legionella pneumophila</i> based on imaging ellipsometry [205] | <i>Legionella pneumophila</i> | lame de verre couche d'or | Anticorps | résonance de plasmon et ellipsométrie | 10 ⁶ UFC.L ⁻¹ |
| The rapid and specific real-time detection of <i>Legionella pneumophila</i> in water samples using Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy [206] | <i>Legionella pneumophila</i> | Lame de verre avec couche d'oxyde de tantale | Anticorps | Optical Waveguide Lightmode spectroscopy (OWLS) | 1.3 10 ⁷ UFC.L ⁻¹ |
| Microelectrode array biosensor for the detection of <i>Legionella pneumophila</i> . | <i>Legionella pneumophila</i> sg 5 | surface en verre avec couche de | Anticorps | spectroscopie d'impédance électrochimique | 10 ⁸ UFC.L ⁻¹ |

| [207] | | PDMS | | | |
|---|-----------------------------------|---|-----------|---|---------------------------------------|
| SPR based immunosensor for detection of <i>Legionella pneumophila</i> in water samples. [208] | <i>Legionella pneumophila</i> | Titane dopé par l'or | Anticorps | Résonance de plasmon (SPR) | 10 ⁶ UFC.L ⁻¹ |
| Immunosensor for detection of <i>Legionella pneumophila</i> using surface plasmon resonance. [209] | <i>Legionella pneumophila</i> | lame de verre couche d'or | Anticorps | résonance de plasmon et spectroscopie | 10 ⁸ UFC.L ⁻¹ |
| Disposable Immunochips for the detection of <i>Legionella pneumophila</i> using electrochemical impedance spectroscopy. [210] | <i>Legionella pneumophila</i> sg1 | électrode sérigraphiée (couche d'or) | Anticorps | spectroscopie d'impédance électrochimique | 2 10 ⁵ UFC.L ⁻¹ |
| Detection of <i>Escherichia coli</i> O157 :H7, <i>Salmonella typhimurium</i> , and <i>Legionella pneumophila</i> in water using a flox-through chemiluminescence microarray readout system. [211] | <i>Legionella pneumophila</i> | électrode en verre modifiée par poly(éthylène glycol) | Anticorps | chemiluminescence | 10 ⁸ UFC.L ⁻¹ |

Il reste donc nécessaire de développer des immunocapteurs permettant de diminuer la limite de détection tout en utilisant des systèmes de détection les plus simples possibles (coût, disponibilité des appareils).

Bénéficiant d'un anticorps monoclonal de spécificité remarquable [112], nous nous sommes ainsi axés sur des électrodes à coût raisonnable (ITO) permettant une détection des éléments capturés (*L. pneumophila*) par électrochimie.

II. Les capteurs

II.1. Introduction

Au cours des dernières décennies, les évolutions considérables des méthodes analytiques mises en jeu dans les domaines de la médecine, de l'agro-alimentaire ou le contrôle de l'environnement, ont nécessité le développement des techniques de détection d'agents contaminants (bactéries pathogènes en particulier) de plus en plus rapides et sélectives.

Dans ce contexte, l'utilisation de capteurs représente une solution potentiellement économique pour réaliser des mesures de contamination in situ.

II.2. Historique

La détection ainsi que la qualification d'une espèce biochimique et l'évaluation de sa quantité (ou de sa concentration) reposent sur l'utilisation d'instruments analytiques comme les chromatographes ou les différents spectromètres.

En 1950, Leland Clark a développé le premier capteur pour mesurer la concentration d'oxygène dissoute dans le sang. Sa collaboration avec Lyons en 1962, a permis l'évolution de ce biocapteur en l'associant à une membrane enzymatique contenant la glucose-oxydase, et une électrode à oxygène dans le but d'évaluer la concentration en glucose dans le sang [212]. Cinq années plus tard, Updike et Hicks ont élaboré une électrode enzymatique permettant le dosage du glucose dans des solutions biologiques [213]. A la fin des années 70 (1969), Georges Guilbault a élaboré un dispositif pour le dosage de l'urée dans le sang et l'urine [214 ; 215].

II.3. Définition

Dans la littérature, un capteur électrochimique est un dispositif électronique capable de convertir une information physique, chimique ou biologique en une information électrique, généralement une tension ou un courant [216].

Un capteur est un système analytique biologique qui, conjointement avec un transducteur physicochimique, est capable de traduire une reconnaissance biologique d'une biomolécule cible, en un signal physiquement mesurable [217].

L'intérêt de développer les biocapteurs est d'aboutir à un dispositif analytique rapide de taille réduite, portatif, capable de doser directement l'analyte d'intérêt, sans des prétraitements ou l'ajout des réactifs à l'échantillon [218].

Depuis l'élaboration des biocapteurs, le nombre de publications et de brevets scientifiques ne cesse d'évoluer. Leur développement a même incité l'invention de journaux spécifiques, citant le journal Biosensors and Bioelectronics, édité par Elsevier. Néanmoins, malgré l'existence de certaines applications commerciales (le biocapteur « glucose pen » [219]), le marché des biocapteurs est encore limité, par rapport à leurs domaines d'applications possibles [220].

II.4. Domaine d'application des biocapteurs

Les biocapteurs connaissent un grand succès d'application dans les domaines médical et clinique. Les applications grand public, comme le test de glucose pour les personnes atteintes de diabète, contribuent à l'expansion commerciale des biocapteurs [221]. La plupart des biocapteurs développés concerne des applications médicales et cliniques.

Les biocapteurs connaissent aussi des applications dans les domaines de l'industrie alimentaire ou l'analyse environnementale. Les biocapteurs environnementaux révèlent des informations cruciales sur la qualité de l'eau, allant de la détection des détergents à l'analyse d'indices tels que la demande biochimique en oxygène (BOD) [222], traduisant la quantité d'oxygène dans l'échantillon (indice important pour la récupération des eaux usées) ainsi que la concentration en ions phosphate [223].

II.5. Principe de fonctionnement d'un biocapteur

L'élaboration d'un biocapteur est principalement basée sur l'accrochage d'un biorécepteur au contact du transducteur correspondant (Figure 4). En effet, c'est grâce à cette combinaison judicieuse qu'un biocapteur permet la détection et le dosage d'un analyte d'intérêt dans un échantillon hétérogène.

Le biocapteur est constitué de trois éléments principaux [218] :

- Le biorécepteur : c'est l'entité biologique qui assure la bio-reconnaissance de l'élément cible (signal d'entrée).

- Le transducteur, qui assure la traduction de ce signal d'entrée (événement de bio-reconnaissance) en un signal mesurable.
- Le conditionneur, qui assure l'acquisition, l'amplification et le traitement du signal, pour le convertir en une information appropriée pour l'utilisateur.

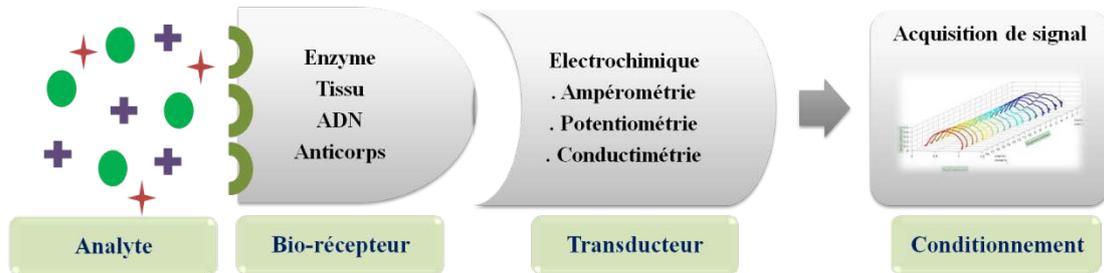


Figure 4 : Représentation schématique d'un biocapteur

II.6. Classification des biocapteurs

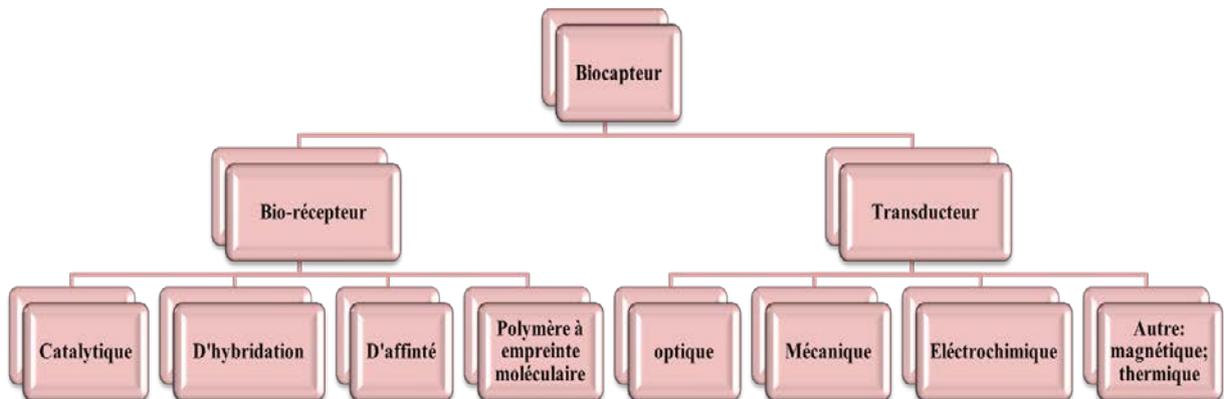


Figure 5 : Classification des biocapteurs

Les biocapteurs peuvent être classés suivant différents types de critères (Figure 5) :

- Par type de biorécepteur : biocapteur immunologique, enzymatique, à cellules entières...
- Par type de transducteur : biocapteur optique, thermique, électrochimique ...

II.7. Description du biocapteur

II.7.1. Biorécepteur

Le biorécepteur représente le premier maillon du biocapteur. Il assure l'identification de l'espèce d'intérêt grâce à son site sélectif. Il permet ainsi la bio-reconnaissance moléculaire, liée ou non à la transformation de l'analyte à mesurer. Dans un biocapteur, le biorécepteur offre une sensibilité et une spécificité importante particulière de l'espèce à détecter, ainsi qu'une réponse rapide.

Dans ce contexte, divers types de biorécepteur ont été utilisés comme outils de bio-reconnaissance moléculaire (Figure 6).

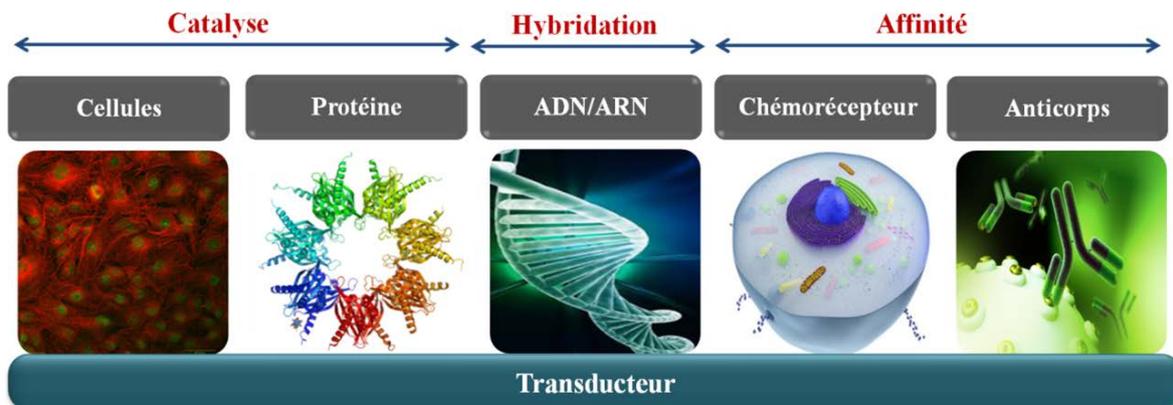


Figure 6 : Représentation schématique de quelques biorécepteurs

- **Les biorécepteurs catalytiques :**

Les biorécepteurs catalytiques, comme les enzymes, présentent un fort intérêt pour différentes applications industrielles.

Les enzymes sont des macromolécules biologiques, chargées des transformations biochimiques des molécules de l'organisme vivant, c'est le phénomène de catalyse enzymatique.

A la fin du 18^{ème} siècle, Lazzaro Spallazani a été le premier à décrire le phénomène de la catalyse enzymatique.

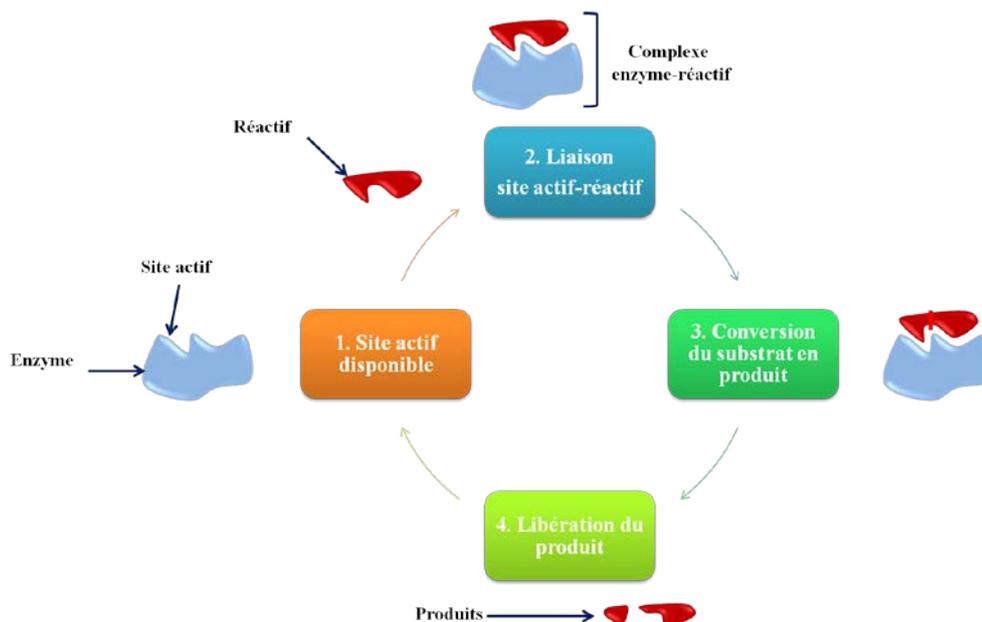


Figure 7 : Principe de la réaction catalytique d'un enzyme (type protéase)

Les enzymes ont été utilisées dans les premiers biocapteurs [212]. Ce sont des macromolécules le plus souvent de nature chirale (ne possédant pas de symétrie) et protéique.

Les enzymes sont des protéines à site actif qui leur confère l'activité catalytique pour transformer un substrat donné en un produit (Figure 7). Cependant, le substrat va se lier au site actif de l'enzyme afin de permettre la formation d'un complexe intermédiaire enzyme-substrat (E-S). Suite à la coupure de cette liaison (entre le site actif et l'E-S), comme la durée de vie de ce complexe intermédiaire est bien définie et limitée, un produit de la réaction va être formé [224].

Les enzymes peuvent être classées en deux catégories, (i) les enzymes redox (oxydase, réductase, oxydo-réductase) qui utilisent les électrons comme substrats et produits de réaction, et (ii) les enzymes hydrolytiques (lipases, protéases, estérases) qui utilisent les protons comme substrats et produits de réaction.

Les capteurs catalytiques sont des capteurs chimiques dont l'enzyme ou « ligand » est immobilisée sur le transducteur de l'électrode (en négligeant le phénomène de transfert de masse au niveau de cette interface). L'électrode modifiée avec la couche enzymatique est en contact direct avec le liquide contenant le substrat à doser. Ce dernier va entrer à l'intérieur de cette couche enzymatique, pour s'attacher au site actif, puis se décomposer en produit de réaction catalytique. En effet, pour respecter l'équilibre des concentrations substrat/produit, la solution doit être bien agitée et la couche enzymatique aussi fine que possible [225].

Les différentes étapes de fonctionnement d'un capteur catalytique sont :

- Migration du substrat de la solution vers la membrane enzymatique.
- Diffusion du substrat à l'intérieur de cette couche, dont une transformation enzymatique de substrat en produit de réaction.
- Diffusion du produit vers le transducteur.
- Traduction par le transducteur de concentration de ce produit en un signal électrique.

L'activité catalytique de l'enzyme dépend de sa structure native, et sa dénaturation supprime l'activité de site actif. La réponse de capteur enzymatique peut être affectée par plusieurs facteurs tels que le pH [226] (qui peut agir sur l'état d'ionisation des fonctions chimiques des chaînes latérales de l'enzyme, comme il peut agir sur les acides aminés de contact chargés de l'interaction avec le ligand ainsi que les acides aminés auxiliaires, les acides aminés collaborateurs responsables de la conformation de site actif de l'enzyme) et la température [225 ; 227] (l'élévation de la température peut augmenter la vitesse de la réaction mais dénaturer l'enzyme).

- **Les biorécepteurs d'hybridation :**

Les acides nucléiques sont des macromolécules biologiques structurées par des chaînes polymériques, renfermant l'information nécessaire pour la synthèse des protéines. En plus de leur rôle comme biomolécule d'intérêt biologique, elles permettent de développer des biocapteurs d'ADN (acide désoxyribonucléique) capables d'analyser des gènes *in situ* [228]. Les molécules d'ADN peuvent être immobilisées sur un transducteur physique en tant que double brin pour étudier des interactions possibles avec des drogues synthétiques, ou en tant que simple brin pour détecter les processus d'hybridation.

L'utilisation d'un ADN double brin, qui est immobilisé sur un transducteur électrochimique ou optique, a connu des développements importants pour un dépistage rapide des toxines ou des substances organiques cancérigènes, ainsi que l'identification des principes actifs anti-tumoraux [229].

Les biocapteurs d'ADN simple brin dits aussi biopuces, représentent une nouvelle technologie qui exploite la complémentarité de deux oligonucléotides. De tels biocapteurs sont capables d'identifier la séquence d'un gène, et détecter des mutations génétiques [230]. Cette nouvelle technique de détection d'ADN a gagné un grand intérêt ces dernières années à cause de son importance considérable pour un diagnostic précoce de certaines maladies,

comme l'hypercholestérolémie ou le cancer, favorisé par le décodage du génome humain [231]. Ces biopuces à base d'ADN ont mis en valeur ce domaine, en offrant la possibilité de réaliser plusieurs analyses génétiques en même temps que ce soit dans le domaine du génotypage, du diagnostic, de la pharmacogénomique ou de l'analyse globale de l'expression génétique [232].

- **Les aptamères :**

Un aptamère est une petite séquence synthétique d'oligonucléotide simple brin (ADN, ARN ou nucléotide modifié) relativement courte (entre 15 et 60 bases), capable de subir des repliements complexes et de se lier, avec affinité et spécificité élevées, à des molécules cibles comme des médicaments, protéines, peptides, voire même des cellules entières, virus ou bactéries.

Le terme aptamère a été employé pour la première fois en 1990 par Ellington et Szostak [233]. En fait, sa découverte est reliée à la mise au point d'une technologie responsable de la sélection de ces séquences d'oligonucléotides pour une cible choisie, dite SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) [234].

La technique de sélection des aptamères repose sur trois étapes indispensables : (i) synthèse d'une réserve suffisante par amplification des échantillons d'oligonucléotides spécifiques, à partir de laquelle seront choisies les meilleures séquences ; (ii) un criblage de ces séquences selon leur affinité pour la cible par diverses techniques (électrophorèse, chromatographies, rétention sur filtre ...) et ; finalement (iii) identification et amplification des séquences retenues par la technique PCR (réaction en chaîne par polymérase) [235].

L'utilisation des aptamères a concerné divers domaines [236], notamment le domaine d'analyse médicale [237 ; 238] et même thérapeutique lorsque l'aptamère présent, outre que ses propriétés spécifiques, joue le rôle d'inhibiteur pour sa cible protéique.

L'utilisation des aptamères présente de nombreux avantages. Ce sont des molécules de petite taille, souvent flexibles et stables chimiquement. Leur production est peu coûteuse, et leur utilisation n'exige pas des conditions physiologiques. Leur modification est aisée, permettant l'incorporation de molécules marqueurs, ou pour faciliter leur immobilisation sur support solide.

La sensibilité des biocapteurs à aptamères dépend du transducteur utilisé. En effet, des transducteurs utilisés en coordination avec des aptamères, ont montré d'excellents résultats

[236 ; 239] pour une large variété d'application, telles que la détection d'agents pathogènes, ou pour des diagnostics médicaux [240].

- **Les polymères à empreintes moléculaires :**

La notion d'empreinte moléculaire connaît une évolution depuis les années 90. En 1949, Dickey a mis en évidence, pour la première fois, la technologie d'empreinte moléculaire dans le but de la création des récepteurs synthétiques vis-à-vis des molécules cibles [241].

Le polymère à empreinte moléculaire (MIP) est obtenu après polymérisation de monomères fonctionnels, suite à une irradiation sous UV ou par effet thermique, en présence d'un agent réticulant (dit « cross-linker », c'est une molécule capable de s'intégrer entre les longues chaînes de polymères pour les lier entre elles et ainsi solidifier la solution en formant un réseau en 3D) et un agent porogène (en lui ajoutant à une solution, il donne un produit spongieux), autour d'un type bien défini de molécule cible dite « patron » pour lui créer une cavité de reconnaissance spécifique. Cette structure en 3D nouvellement synthétisée [242] sera utilisée comme récepteur artificiel d'une molécule avec la même affinité et la même spécificité que celles obtenues par des biorécepteurs naturels [243 ; 244]. Comme ils sont de nature synthétique, ces MIPs sont caractérisés par une dureté et stabilité importante, permettant leur utilisation lors des conditions drastiques (conditions acide, basique ...).

La synthèse des MIPs passe par trois étapes :

- Pré-arrangement entre molécule patron et monomères fonctionnels : soit par liaison non covalente (auto-assemblage de molécule cible à imprimer avec le monomère fonctionnel par l'intervention des liaisons de type hydrogène, dipôle-dipôle et interaction ionique, pour créer un site de reconnaissance spécifique tout en gardant en mémoire la forme et les groupements fonctionnels, puis le complexe est réticulé soit par un monomère réticulant) [245] soit par une liaison covalente (formation d'une molécule cible polymérisable suite à une liaison covalente entre la molécule patron et les monomères fonctionnels. Après la copolymérisation avec le monomère réticulant, la molécule imprimée ne peut être obtenue que par rupture chimique, généralement par hydrolyse) [246].
- La polymérisation : la synthèse de MIPs impose une étape de copolymérisation entre le monomère fonctionnel et le monomère réticulant autour de molécule cible pour former un réseau de polymère rigide.

- **Elimination de la molécule cible :** Cette molécule peut être ensuite détachée du complexe de polymérisation, permettant l'apparition d'une cavité de reconnaissance spécifique, présentée par une structure et une organisation en groupes fonctionnels, identiques à la molécule cible.

Dans la littérature, les MIPs sont intégrés dans plusieurs types de biocapteurs comme ceux qui peuvent être utiles dans la séparation et l'analyse des échantillons complexes tels que les liquides biologiques et les échantillons environnementaux [247]. Ces biorécepteurs artificiels peuvent éviter toutes contraintes de dénaturation rencontrées telles que pH, température, temps de conservation ... pour assurer une stabilité et reproductibilité élevés, mais la variété des molécules cibles dans le milieu hétérogène à analyser, peut limiter les possibilités de reconnaissance biologique par les MIPs.

- **Les biorécepteurs d'affinité :**

Les biorécepteurs d'affinité sont des molécules biologiques offrant la possibilité d'une reconnaissance spécifique. Les molécules les plus utilisées sont les immunoglobulines (ou anticorps) présentant des avantages tels que la sensibilité, la sélectivité et l'affinité. A la différence de la biocatalyse, la reconnaissance immunologique n'implique pas de consommation de substrat ou de formation de produits de réaction.

En fait, les anticorps sont des glycoprotéines. Elles sont produites après une réponse immunitaire, provoquée par l'introduction d'un antigène étranger dans un organisme (Homme ou animal) [248]. Un anticorps de type polyclonal est obtenu par purification du sérum de l'animal sur l'antigène correspondant. Un anticorps de type monoclonal (le type le plus spécifique) est obtenu par culture cellulaire, *in vitro*, à partir d'une cellule, appelée hybridome, suite à une fusion cellulaire entre une cellule productrice d'anticorps (le lymphocyte B) et une cellule de tumeur (myélome) qui lui accorde les propriétés d'immortalité de la lignée. Ainsi, ces systèmes de production permettent l'obtention de grandes variétés d'anticorps, en leur donnant un aspect de biorécepteurs.

D'après Porter-Edelman (1958), les immunoglobulines sont des protéines composées de 4 chaînes polypeptidiques ; deux chaînes lourdes (d'environ 50 kDa, 450 AA, chacune est composée de trois ou quatre domaines constants C_H et un domaine variable V_H) associées à deux chaînes légères (d'environ 25 kDa, 212 AA, chacune est composée d'un domaine constant C_L et un domaine variable V_L) identiques, et reliées entre elles par des ponts disulfures [249]. La structure de l'anticorps, généralement en forme Y (Figure 8), se présente en deux parties : le Fragment cristallisable (Fc, commun à tous les immunoglobulines d'un

même mammifère) et deux Fragments Antigen Binding (Fab, sites de liaison à l'antigène). Cette structure en Y est commune pour les différents types des anticorps (IgG, IgM, IgA, IgD et IgE) qui diffèrent entre eux en termes de séquence et organisation protéiques. La biosynthèse des molécules d'anticorps dépend du stade de maturation des cellules de lymphocyte B [250]. En effet, au stade de maturation pro-B, les réarrangements des zones constantes des chaînes lourdes ont lieu, suivis par des appariements des zones variables des chaînes lourdes au stade des cellules pré-B. Au cours de ces deux stades de maturation, une expression des enzymes de recombinaison, permet la conformité des chaînes lourdes [251]. Au niveau de stade de maturation pré-B, une pseudo-chaîne légère s'exprime [252]. Au stade lymphocyte B immature, cette pseudo-chaîne légère est remplacée par une chaîne légère fonctionnelle. Et finalement, les lymphocytes B matures sont capables d'exprimer des molécules d'immunoglobulines à leur surface, possédant des zones variables identiques entre elles, ainsi qu'améliorer leur affinité pour les antigènes.

Pour intensifier la reconnaissance entre antigène-anticorps, il faut s'intéresser au fragment Fab des immunoglobulines. La zone de liaison qui réagit avec l'antigène est dite paratope (dans des anticorps divalents, les deux paratopes sont identiques) et la zone sur l'antigène qui interagit avec l'anticorps est dite épitope (complémentaire au paratope). Le paratope est composé de trois zones hypervariables ou Complementary-Determining Regions (CDR) sur chaque immunoglobuline lesquelles sont liées entre elles dans l'espace par des liaisons non covalentes. La liaison des CDR avec l'épitope de l'antigène est responsable de la reconnaissance Ag-Ac [253].

Les mesures thermodynamiques montrent que l'interaction antigène-anticorps est réversible, impliquant une énergie de liaison qui varie de 34 à 65 kJ/mole. Ces données éliminent la supposition d'interaction de liaisons covalentes dont l'énergie est d'environ 210 à 500 kJ/mole. L'interaction Ag-Ac se fait donc par l'intervention des liaisons de type hydrogènes, hydrophobes, électrostatiques et Van Der Waals. Ainsi, leur K est d'environ 10^{15} , la liaison mise en jeu est forte grâce aux interactions moléculaires nombreuses, mettant en valeur la notion de valence.

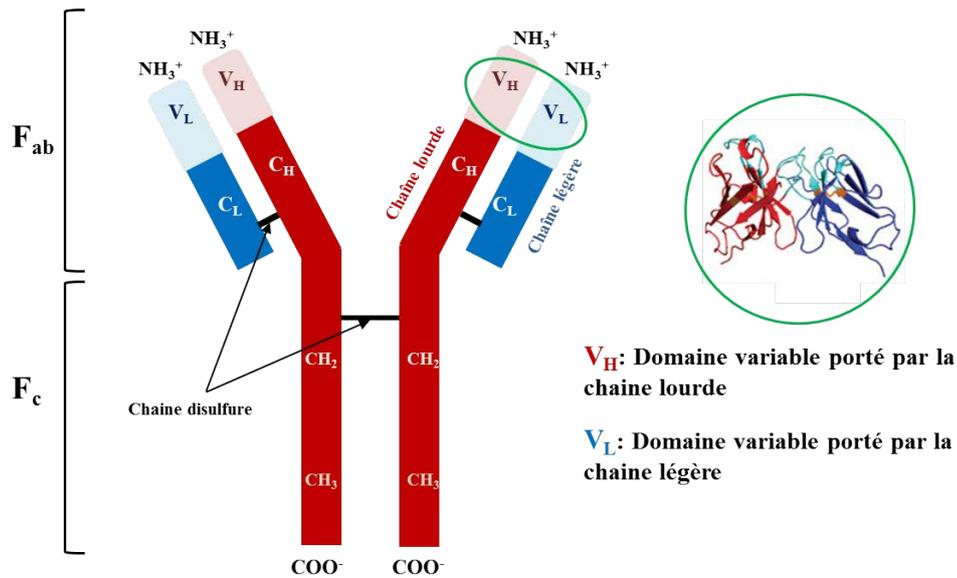


Figure 8 : Représentation schématique d'un anticorps et de la partie se liant à l'antigène, le paratope

Les immunocapteurs permettent la détection immunologique directe, sans marquage, afin de suivre les interactions Ag-Ac. La mise au point des techniques de liaison Ag-Ac permet de mesurer un signal physique suite à la formation du complexe immunitaire. Ainsi, trois types de détection immunologique, ont été utilisés : détection optique [254], piézoélectrique [255] et électrochimique [256].

Dans ce dernier cas, des approches récentes fixent les anticorps de façon covalente sur les surfaces des transducteurs, en montrant la détection immunologique spécifique directe (sans marquage) et en temps réel par mesure d'impédance électrochimique (SIE) [257]. La structure des anticorps contient plusieurs fonctions carboxyles (COOH) et amines (NH₂) permettant leur immobilisation covalente sur les transducteurs activés par des fonctions d'ancrage correspondantes qui peuvent être par exemples des silanes [180 ; 257] ou des thiols [258].

Les immunocapteurs ont montré un potentiel élevé dans le domaine des applications diagnostic, comme par exemple le diabète insulino-dépendant [259] et les biomarqueurs spécifiques du HIV (Virus de l'immunodéficience humaine) [260], à cause de leur importante spécificité envers l'agent à détecter [261].

II.7.2. Le transducteur

Le transducteur est l'élément physique dans le biocapteur qui sert à traduire la modification biochimique suite à l'interaction analyte-biorécepteur pour la convertir en un signal électrique mesurable. Le type de transducteur est choisi en fonction des transformations biochimiques au niveau du biorécepteur [262].

Le choix du transducteur dépend [225] :

- Du type de réaction et de substances consommées ou libérées : modification de charge, de pH, variation de la fluorescence...
- De l'utilisation du biocapteur : un biocapteur pour les analyses biomédicales doit être à usage unique alors qu'un biocapteur pour les analyses environnementales doit être robuste...
- Des possibles interférences : dans les milieux troubles, une détection optique n'est pas recommandée...

Différents types de transducteurs sont utilisés pour la conception de biocapteurs. En effet le transducteur peut être gravimétrique (mesurant le changement de masse résultat d'une réaction biologique), optique (pour mesurer les changements tels que la fluorescence, l'indice de réfraction ou l'absorption optique), thermique (pour mesurer le changement thermique avec une réaction endo ou exothermique) ou électrochimique (basé sur le changement des propriétés électriques ou mécanique) [263].

Au cours de notre thèse, nous nous sommes intéressés à un transducteur électrochimique.

Dans le cas de **la transduction électrochimique**, l'immobilisation de l'analyte sur le biorécepteur produit une réaction d'oxydoréduction ou encore changement de la conductivité locale qui génère une modification de signal électrique. Ces transducteurs sont basés généralement sur une électrode fonctionnalisée par des entités biologiques et fonctionnent le plus souvent dans un milieu liquide.

- **Transducteur impédimétrique :**

L'impédance électrochimique est le rapport de la réponse fréquentielle potentiel/courant. Sa première publication remonte à 1975.

Le principe du capteur impédimétrique repose sur la mesure de l'impédance par la technique de spectroscopie d'impédance électrochimique, dont le principe sera détaillé dans le paragraphe de la caractérisation de transducteur par des mesures électrochimiques.

Cette technique permet de suivre le phénomène de transfert de charge au niveau de l'interface électrode/électrolyte.

En effet, la mesure de l'impédance se réalise à l'intérieur d'une cellule à trois électrodes, dont une électrode de travail sur laquelle est immobilisée l'élément sensible (biorécepteur), une électrode auxiliaire et une électrode de référence.

En effet, un potentiel appliqué avec une perturbation sinusoïdale de faible amplitude, entre l'électrode de travail et l'électrode de référence, permet de mesurer un courant de la même forme, créé entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire [264].

Le rapport de la tension imposée sur l'intensité du courant résultant mesurée, définit la notion de l'impédance du système électrochimique. L'impédance est représentée par un circuit électrique équivalent. Ce circuit permet de soutirer les paramètres électriques qui définissent le processus de transfert de charge généré à l'interface électrode/électrolyte. La variation de ces paramètres, dépend des variations interfaciales générées à la surface de l'électrode de travail.

Avantageusement, les biocapteurs impédimétriques sont appliqués aux réactions mettant en place des phénomènes de chémorécepteurs membranaires ou d'affinité moléculaire de type Ag-Ac à cause des faibles changements de conductance et de capacitance qui peuvent être détectées au niveau de l'interface entre le substrat immobilisé et l'électrode.

- **Transducteur ampérométrique :**

Les techniques ampérométriques reposent sur la mesure de l'intensité du courant traversant la cellule électrochimique à un potentiel imposé [265]. La réaction de l'analyte avec le biorécepteur immobilisé sur la surface de l'électrode de travail, incite un changement de courant à un potentiel constant. Ce changement provient de la réduction ou de l'oxydation d'une espèce électroactive à un potentiel donné qui se crée au contact de l'électrode de travail. L'intensité du courant induit est proportionnelle à la concentration de l'entité reconnue par le biorécepteur.

Les biocapteurs ampérométriques sont classés en trois catégories [263 ; 265] :

- Biocapteurs mesurant la concentration des analytes naturels ou les produits des réactions enzymatiques. Généralement, les enzymes catalysant ces réactions sont des oxydases [266 ; 267].

- Biocapteurs qui utilisent des médiateurs comme transporteurs des électrons de l'enzyme électroactive à l'électrode [268 ; 269].
- Biocapteurs basés sur un transfert direct entre l'enzyme électroactive et l'électrode. Ce processus est appelé bio-électrocatalyse [265 ; 270].

De nos jours, plusieurs biocapteurs enzymatiques ampérométriques sont commercialisés, tels que le biocapteur de la société Yellow Spring Instruments Company® (Ohio).

- **Transducteur potentiométrique :**

Le transducteur potentiométrique est capable de mesurer l'accumulation de charges électriques sur la surface de l'électrode de travail. Pratiquement cela se traduit par la mesure de différence de potentiel entre l'électrode de référence et l'électrode de travail, pour une intensité du courant nulle. La conception des potentiels des électrodes permet la mesure directe de la concentration de l'analyte à doser [225].

III. Techniques d'immobilisation de biorécepteur sur substrat solide

L'immobilisation des biorécepteurs sur la surface du transducteur est un point crucial pour le comportement et l'utilisation pratique du biocapteur.

Pour avoir une bio-reconnaissance favorable, il est nécessaire de contrôler les critères de l'immobilisation des biorécepteurs :

- Les biorécepteurs doivent maintenir leur activité biologique une fois immobilisés sur la surface de l'électrode de travail.
- Une fois immobilisé, le matériel biologique ne doit pas se détacher, non seulement pendant l'activité de bio-reconnaissance, mais aussi doit résister aux changements des conditions de milieu (température, pH...).
- Les biorécepteurs immobilisés doivent avoir une stabilité et une durabilité au cours de temps.
- Les biorécepteurs doivent avoir une spécificité élevée pour un analyte donné.

Un manque de contrôle sur les conditions précédemment décrites limitera les capacités du biocapteur. Ainsi, pour avoir une bio-reconnaissance optimale, il est nécessaire de respecter l'orientation des biomolécules immobilisées. Le contrôle de la densité et de la distribution des biorécepteurs sur la surface de l'électrode, fait partie des critères importants pour la méthode d'immobilisation de biorécepteurs. Comme il sera vu dans les paragraphes suivants, un point-clé de l'accroche de biomolécules sur un substrat concerne les interactions non-spécifiques.

En effet, les milieux complexes à analyser (tels que les milieux environnementaux, les sérums ...) sont composés d'une variété importante d'espèces qui peuvent interférer avec la couche biologique de reconnaissance. Ces interactions non désirées peuvent être, en grande partie, limitées par la couche d'immobilisation.

C'est ainsi en pensant à l'ensemble des critères de l'immobilisation des biorécepteurs sur surface solide, que des méthodes d'immobilisation de biorécepteurs prometteuses sont développées non seulement en fonction du type de biorécepteur et de son fonctionnement mais aussi pour la construction de biocapteurs en adéquation avec les besoins, comme nous le verrons par la suite.

III.1. Adsorption directe sur substrat solide

C'est l'une des techniques les plus simples à mettre en œuvre et ne nécessite généralement pas l'utilisation de réactifs. L'adsorption des biomolécules en solution se fait sur une surface solide par l'intermédiaire des interactions chimiques ou physiques. Les liaisons physiques sont de faible énergie : liaison de Van Der Waals, liaison hydrogène ou liaison ionique. Les liaisons chimiques impliquent le partage ou le transfert d'électrons entre la surface et l'électrolyte, ce qui les rend plus sélectives et plus fortes en formant des ponts chimiques. Du fait de la faible énergie mise en jeu, ces molécules peuvent se désorber lors de changement des paramètres physico-chimiques du milieu tels que pH, température, force ionique ... [271].

Des travaux ont étudié les possibilités d'adsorption directe des protéines sur des métaux nobles, tel que l'or [272].

La bio-reconnaissance d'analyte par le biorécepteur adsorbé n'est pas sans risque, et est difficilement rendue optimum. Ceci est à cause du manque de contrôle de la qualité et la quantité des biorécepteurs adsorbés. En effet, des distributions aléatoires de biorécepteurs orientés au hasard, ont pu être observées par AFM [272], réduisant nettement la capacité de bio-reconnaissance. Cela s'exprime par la formation d'agrégats ou de multicouches sur la surface [273], permettant l'apparition de trous et montrant l'impossibilité de contrôler la densité de biorécepteurs immobilisés.

III.2. Emprisonnement physique

Les méthodes d'immobilisation par emprisonnement physique consistent en l'incorporation des grosses molécules et des cellules entières dans un gélifiant tel que l'agar, [274] le polyacrylamide [275] ou l'agarose [276] ainsi que l'adsorption sur des membranes de

filtration ou de dialyse [277]. En effet, dans la littérature, Vedrine et al. [278] ont immobilisé des cellules d'algues sur un filtre de fibres de quartz afin de détecter des herbicides, en mesurant la fluorescence chlorophyllienne.

Cette méthode d'immobilisation consiste à mélanger le biorécepteur à la matrice, et le déposer sur la surface, dans des conditions contrôlées, afin de l'emprisonner mécaniquement dans le réseau de la matrice. Le polymère permet le passage de l'analyse ainsi que des réactifs, facilitant alors la bio-reconnaissance.

Cette technique de rétention assure une meilleure conservation du biorécepteur comme il n'est pas réellement fixé. Néanmoins, cette technique peut être limitée par la taille des mailles de la matrice ce qui peut libérer les biomolécules. Ainsi, la présence d'un film, crée une barrière de diffusion supplémentaire, ce qui diminue la sensibilité et augmente le temps de réponse.

III.3. Réticulation

La réticulation est le phénomène par lequel des protéines (protéine membranaire, enzyme) sont liées entre elles, par l'intervention des liaisons chimiques covalentes, en présence d'un agent réticulant bifonctionnel, tel que par exemple le glutaraldéhyde. Ainsi, le glutaraldéhyde présente à ses deux extrémités deux groupements aldéhyde, qui réagissent avec des groupements amines primaires des protéines. Cela permet la formation d'un gel réticulé stable. Néanmoins des problèmes de superposition de biomolécules peuvent apparaître permettant la formation des agrégats insolubles ce qui peut affecter la sensibilité du biocapteur. Parfois la réticulation est utilisée en association avec d'autres protéines inertes pour améliorer la cohésion et la stabilité mécanique de la matrice structurale, on parle dans ce cas de la co-réticulation.

III.4. Accrochage covalent des biorécepteurs

L'accrochage covalent est le processus par lequel des biomolécules sont immobilisées sur la surface de transducteurs, par formation des liaisons spécifiques [279]. Contrairement au phénomène de l'adsorption directe, l'accrochage covalent est la technique convenable à l'immobilisation de biorécepteurs sans perte d'activité de bio-reconnaissance [280]. De plus, la majorité des protocoles pour la fixation covalente nécessitent la fonctionnalisation de la surface du transducteur par des molécules chimiques (linéaires ou polymères) ayant une fonction d'ancrage, permettant ainsi un contrôle efficace de l'uniformité, la densité et la distribution des biorécepteurs sur la surface.

Les protocoles de l'immobilisation covalente s'appliquent fréquemment aux biorécepteurs protéiques, tels que les acides aminés, les anticorps et les enzymes. En effet, ces biomolécules possèdent des groupements fonctionnels permettant leur immobilisation, sans interférer avec les parties responsables de la bio-reconnaissance. Comme il a été vu, plusieurs groupements carboxyle et amine interviennent dans la structure de la plupart des protéines, ainsi que d'autres fonctions telles que thiol, imidazole et sulfhydryle. La variété des groupes fonctionnalisables permet le choix du protocole le plus adapté à l'immobilisation de la protéine, ainsi que la nature de surface du transducteur. Même si ces groupements peuvent permettre une fixation covalente directe des protéines sur l'électrode, il est préférable d'introduire une modification chimique à la surface afin d'intégrer des fonctionnalités pouvant être couplées aux biorécepteurs.

Le choix des modifications chimiques dépend de la surface de transducteur et du type de biorécepteurs à immobiliser. Généralement, les substrats les plus utilisés dans l'élaboration des biocapteurs sont l'or, le verre et les oxydes métalliques [281]... Les propriétés particulières de ces matériaux permettent leur modification par des molécules chimiques qui possèdent des fonctionnalités utiles pour l'immobilisation des protéines.

III.4.1. Immobilisation covalente par des polymères

Depuis l'invention des biocapteurs, les polymères ont été utilisés grâce à leurs caractéristiques convenables avec celles requises des biocapteurs. En effet, les polymères synthétiques sont avantageux par leur faible coût, leur résistance ainsi que leur façonabilité.

En outre, la nature des polymères leur donne des propriétés particulières électriques, optiques ou de mouillage, choisis principalement en fonction de transducteur utilisé.

L'efficacité de couche de type 3D des polymères a été largement démontrée. En effet, avec cette structure, la capacité de l'immobilisation spécifique est importante, et les interactions non spécifiques ont été limitées par les propriétés hydrophiles des polysaccharides. Ainsi, dans les milieux biologiques complexes, comme le sérum, cette structure de couche en 3D ne montre que quelques cas d'adsorption non spécifique [282].

D'autres types de polymères ont été aussi utilisés tels que ceux basés sur les chaînes de lysine. En effet, dans l'histoire, les poly-L-lysines (PLC) ont été largement utilisés grâce à leur capacité élevée de s'adsorber sur des surfaces [283], leur adsorption électrostatique sur des surfaces conductrices, provoque leur décrochage par réaction électrochimique, ce qui facilite leur désorption localisée [284].

III.4.2. Immobilisation covalente par SAMs

L'immobilisation des biorécepteurs sur la surface de transducteur est une étape cruciale dans l'élaboration des biocapteurs. La qualité de la couche de biorécepteur formée est en relation directe avec les spécificités et les sensibilités nécessaires à la reconnaissance biologique performante [285].

Le principe de l'élaboration de biocapteur est basé sur la modification de surface de substrat par des molécules fonctionnelles. Ce sont des molécules de type deux dimensions, formées d'un groupement réactif, un bras espaceur et un groupement terminal fonctionnel. Cette étape de modification permet l'obtention des monocouches auto-assemblées (SAMs, Self Assembled Monolayers) et le choix de chimie de greffage permet l'optimisation de la densité et la distribution des biorécepteurs sur le substrat.

- **Concept des monocouches auto-assemblées**

En 1983, Nuzzo et Allara ont commencé les premières études des monocouches auto-assemblées sur un substrat métallique, grâce à leurs domaines variés d'application (capteur [286], électrocatalyse [287] ...)

Les monocouches auto-assemblées dites SAMs (Self-Assembled Monolayers) sont des structures moléculaires auto-organisées suite à un greffage et une organisation spontanée des molécules amphiphiles fonctionnelles sur une surface (Figure 9). Une molécule amphifonctionnelle est une molécule à deux parties dont une première partie présentée par la tête de la molécule qui est conçue d'avoir une forte affinité (généralement de nature chimique) avec la surface, et une autre partie présentée par le reste de la molécule qui ne possède aucune (ou au plus une légère) affinité avec la même surface, mais qui présente une fonction chimique d'ancrage permettant la fixation de biorécepteur. Cette structure permet le contrôle de l'orientation de ces molécules pendant leur fixation. La formation de cette monocouche auto-assemblée sur une surface, permet la modification de ses propriétés physico-chimiques, telles que la mouillabilité, la résistance, la conductivité... [288].

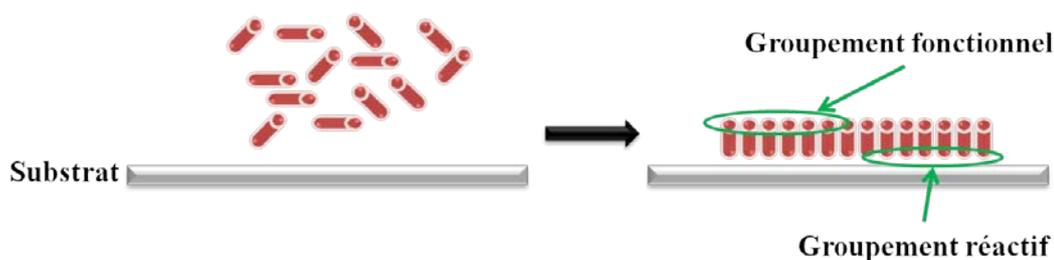


Figure 9 : Formation des monocouches auto-assemblées sur un support solide

Du point de vue énergétique, les précurseurs de SAM sont formés de trois grandes parties assurant chacune un rôle (Figure 10) :

1. La première partie de la molécule est présentée par une tête polaire hydrophile réactive qui peut se greffer sur la surface.

Cette réaction est exothermique et a lieu sur des sites spécifiques qui sont conçues pour apporter une forte affinité entre la tête et le substrat suite à une liaison chimique (la chimisorption). Du fait de l'exothermicité de l'interaction, les molécules vont s'arranger pour occuper tous les sites libres de la surface du substrat, ainsi déplaçant, pendant cette réaction, les molécules qui pouvaient à l'avance être adsorbées à la surface. Ce phénomène est appelé « self cleaning ». L'interaction entre la tête et la surface de substrat, dépend de la molécule utilisée. Elle peut être une interaction ionique (adsorption de l'acide carboxylique sur AgO/Ag) pseudo-covalente ou covalente (comme dans notre cas, l'adsorption de silane sur une surface hydroxylée). Ce processus, spontané, implique une certaine mobilité des molécules à la surface du substrat, ce qui provoque un assemblage dense et ordonné.

2. La partie centrale de la molécule dite corps de la molécule est constituée par une chaîne alkyle apolaire hydrophobe [289]. Cette chaîne peut inclure un ou plusieurs groupements fonctionnels (fonction amide [290 ; 291], fonction phényle [292 ; 293]...) capables de modifier la nature des fonctions intermoléculaires. Lorsque les molécules sont assez proches, suite au phénomène précédent, les interactions intermoléculaires de Van Der Waals entre les chaînes peuvent intervenir. Ces interactions sont d'environ 5 à 10 fois plus faibles que le processus d'adsorption des têtes sur le substrat. Dans le cas où le corps de la molécule inclut des groupements polaires, des interactions électrostatiques peuvent intervenir pour jouer un rôle dominant. Ces interactions participent à la formation d'un assemblage ordonné et dense des molécules. En outre, la longueur des chaînes contribue aussi dans la stabilité et l'ordre des SAMs. En effet, lorsque la longueur des chaînes croît, les forces de Van Der Waals deviennent de plus en plus importantes ce qui augmente l'ordre et la stabilité des SAMs. De ce fait, les longues chaînes sont plus ordonnées que les petites. Mais une longueur assez importante des chaînes (nombre de C > 18) peut perturber la structure des SAMs.

3. La troisième et dernière partie est présentée par un groupement fonctionnel ou polyfonctionnel variable au gré de l'expérimentation visée (R = COOH, NH₂, CH₃,

OH ...). Il constituera le site d'accueil privilégié, après activation si nécessaire, pour un accrochage covalent de biorécepteur.

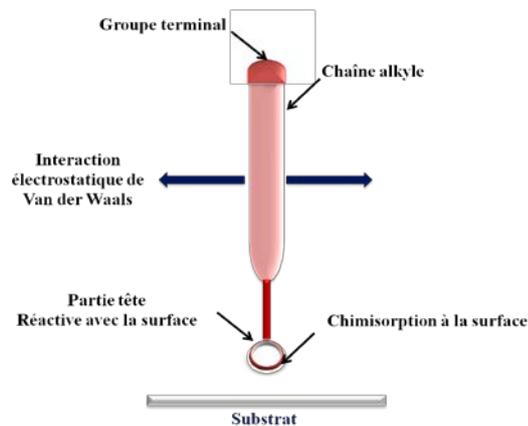


Figure 10 : Schéma de base d'une molécule amphiphile pouvant former une couche SAM [294]

La formation des SAMs sur la surface de substrat (Figure 11) passe par deux phases de cinétiques successives :

- Une première phase, très rapide, qui ne dure que quelques minutes, favorisant la couverture quasi-totale de la surface.
- Une deuxième phase, lente, qui dure plusieurs heures, jusqu'à ce que la formation de la couche initiale s'achève, se structure, par le réarrangement des chaînes alkyles et l'achèvement du processus de « self cleaning ».

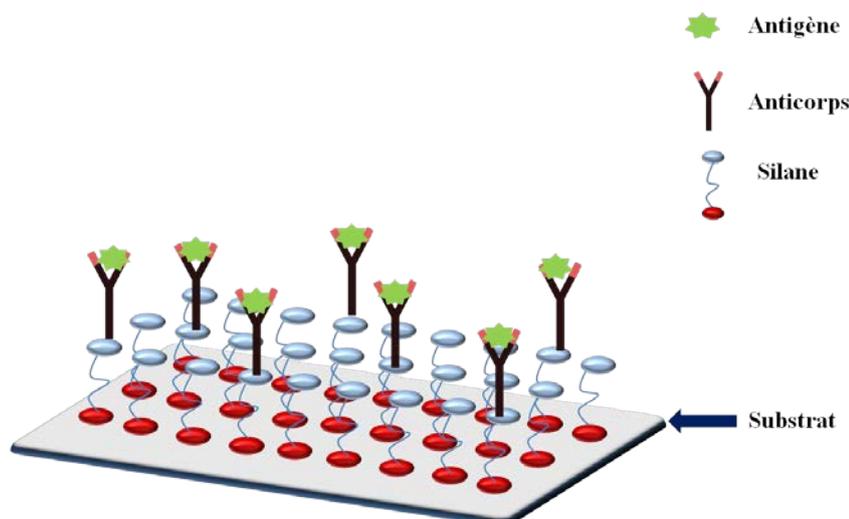


Figure 11 : Immobilisation covalente de biorécepteurs sur une surface d'ITO par l'intermédiaire d'une monocouche auto-assemblée de silane

Le choix des fonctions terminales des molécules dépend de la chimie d'activation en fonction des groupements visés sur les biorécepteurs. Les fonctions terminales les plus souvent utilisées sont de type carboxyle (-COOH), hydroxyle (-OH), méthyle (-CH₃), amine (-NH₂). Parmi elles, les fonctions amines et carboxyles sont utilisées pour l'immobilisation des biorécepteurs alors que les groupes méthyles et surtout hydroxyles limitent les adsorptions non-spécifiques.

La minceur et la stabilité des monocouches auto-assemblées, les destinent à de nombreuses applications [295 ; 296 ; 297].

Dans notre étude, nous allons nous intéresser spécialement aux SAMs de silanes qui sont capables de fournir un film organisé sur des substrats d'indium tin oxyde (ITO) caractérisés par une transparence optique et une conductivité électrique.

Le groupement fonctionnel terminal de la chaîne de silane pourra être varié selon le choix de l'expérimentateur dans le but de la réalisation des surfaces hydrophiles ou hydrophobes ou pour le greffage de certaines molécules.

IV. Caractérisation de transducteur par des mesures électrochimiques

Il existe, en électrochimie, plusieurs méthodes pour caractériser l'adhésion bactérienne sur une surface solide

IV.1. Etude par voltamétrie cyclique (CV)

La voltamétrie cyclique est définie comme une technique électrochimique stationnaire qui est couramment utilisée pour contrôler les processus qui se produisent sur la surface de l'électrode de travail. Cette technique est souvent employée en électrochimie grâce à sa capacité de pouvoir à la fois élaborer un matériau et ensuite le caractériser.

Principe :

La voltamétrie cyclique (ou voltampérométrie) repose sur l'application d'une différence de potentiel électrique variable et contrôlée, entre l'électrode de référence et l'électrode de travail. Le potentiel est appliqué sous la forme de balayage triangulaire (balayage aller et balayage retour) en fonction du temps. Cette technique consiste à étudier les propriétés de la réaction d'oxydoréduction qui se produit à l'interface de l'électrode de travail, suite au transport des ions de l'espèce électroactive, vers le substrat (électrode de travail). La réponse

du système se présente par une courbe de courant, mesuré entre la contre électrode et l'électrode de travail, en fonction du potentiel appliqué $I=f(E)$ (Figure 12).

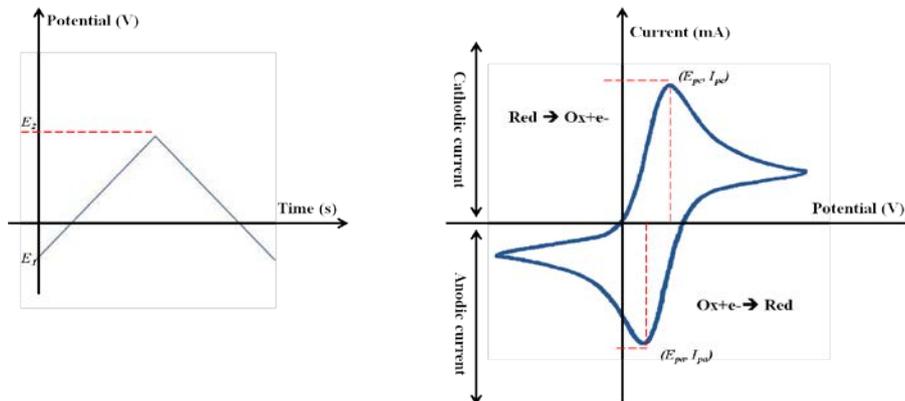


Figure 12 : Voltamétrie cyclique. (A) : forme du potentiel appliqué ($E= f(t)$), (B) : réponse en courant $I= f(E)$)

Dans un système réversible, le potentiel imposé au début est faible, parce qu'il n'y a pas encore de réaction d'oxydoréduction. En augmentant le potentiel imposé (lors du balayage aller), la réaction d'oxydation devient favorable, pour que les espèces réduites au voisinage de l'électrode s'oxydent avec transfert d'électron vers l'électrode de travail, favorisant la diffusion des espèces réduites vers la surface de l'électrode.

L'augmentation du potentiel imposé au cours de temps, favorise et accélère le transfert de l'espèce réductrice de la solution vers l'électrode où elle sera oxydée. Le transfert des électrons vers la surface, augmente, au fur et à mesure, l'intensité du courant mesuré jusqu'à un maximum (E_{pa}). Cela s'explique par la diminution progressive des réactifs de la solution à proximité de l'électrode de travail, le processus de diffusion des espèces réduites devenant de plus en plus limitant.

En absence de réaction chimique, il y a que le courant capacitif, mais, dès qu'une réaction chimique se déclenche à la surface du substrat (l'électrode de travail), le courant augmente. Il atteint un maximum avant d'atteindre un palier. Cette forme particulière se traduit par l'augmentation de la concentration des substances électro-chimiquement actives à proximité de l'électrode de travail.

Le balayage retour offre des informations sur la réversibilité de la réaction électrochimique, suite à la détermination de l'intensité de courant faradique enregistrée. Le tracé présentera un deuxième pic (de réduction) qui indique l'intensité du courant cathodique

résultant de la réduction de l'espèce oxydée produite au cours de balayage aller et présente au niveau de la couche de diffusion.

IV.2. Etude par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)

La technique de spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) se distingue des autres méthodes par deux points :

- L'impédance repose sur la superposition au potentiel de l'électrode d'une tension sinusoïdale de faible amplitude (quelques mV) :

$$E_t = E_0 + \Delta E \sin \omega t$$

Avec :

$\omega = 2\pi f$: Fréquence angulaire ; f est la fréquence (Hz) ;

E_0 : potentiel d'équilibre (V) ;

- L'analyse de réponse du courant (I_t) se fait en fonction de la fréquence (f) :

$$I_t = I_0 + \Delta I \sin (\omega t - \varphi)$$

Avec :

φ : Déphasage (rad).

L'application des mesures d'impédance exige l'utilisation d'une excitation de type alternatif sinusoïdal. Une tension uniquement sinusoïdale se présente par la formule suivante (Figure 13) :

$$E_t = E \sin \omega t$$

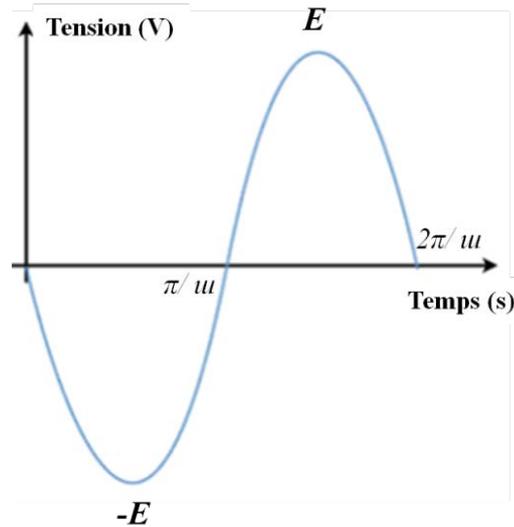


Figure 13 : Diagramme de phase pour une tension alternative

Le courant sinusoïdal se présente généralement par :

$$I_t = I \sin (\omega t + \varphi)$$

La spectroscopie d'impédance présente de nombreux avantages.

Les plus importants sont :

- une capacité à faire des mesures de grande précision ;
- une habilité à traiter des réponses théoriques à l'aide des caractéristiques de courant potentiel linéaire ;
- une large gamme de fréquence (allant de 10^{-4} à 10^{+6} Hz).

A la fin du 19^{ème} siècle, Warburg a été le premier qui a utilisé la notion d'impédance électrochimique en décrivant l'impédance comme un processus de diffusion électrique, portant toujours son nom «impédance de Warburg».

- **Description de l'impédance**

De point de vue physique, une impédance $Z(\omega)$ est une résistance complexe qui va se créer lors de circulation d'un courant alternatif à travers un circuit comportant des résistances, des capacités et des inductances. Dans ce cas, la loi d'Ohm se présente par :

$$E_t = I_t Z (\omega)$$

L'impédance électrochimique se calcule pour chaque fréquence, et est un nombre complexe :

$$Z = Z_{re} + jZ_{im}$$

Ou

$$Z(\omega) = \frac{E_t}{I_t} = |Z|e^{j\varphi} = \frac{\Delta E}{\Delta I} (\cos \varphi + j \sin \varphi)$$

Avec :

$|Z|$: Module de l'impédance (Ω).

Φ : Angle de déphasage (rad).

- **Représentation graphique de l'impédance selon le diagramme de Nyquist :**

Ce diagramme est une représentation alternative de $-Z_{im}$ (impédance imaginaire) en fonction de Z_{re} (impédance réelle).

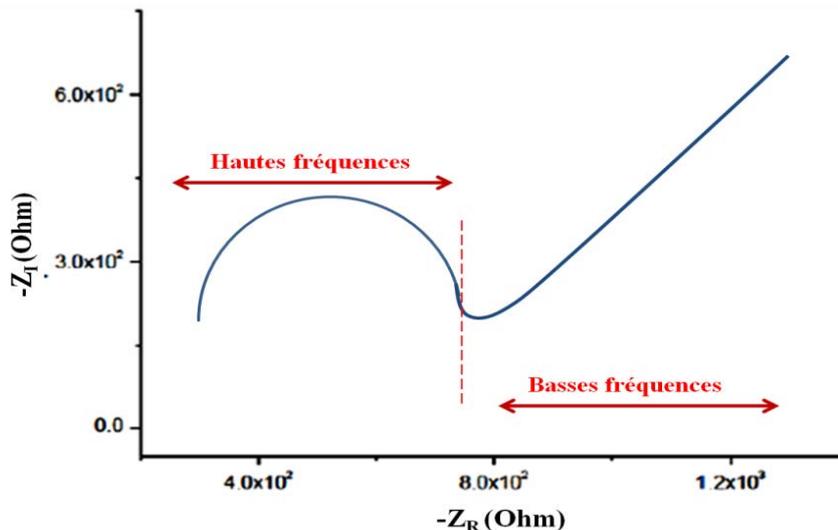


Figure 14 : Diagramme de Nyquist représentant $-Z_{im}$ en fonction de Z_{re} .

Comme l'illustre la figure 14, aux hautes fréquences, le diagramme de Nyquist du circuit de Randles est présenté par un demi-cercle exprimant la résistance de transfert de charge R_{TC} et la capacité de la double couche C_{DL} . Aux basses fréquences, l'impédance de Warburg Z_W est prédominante et le tracé devient linéaire avec une pente égale à l'unité.

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) permet la différenciation des différents phénomènes qui peuvent se réaliser dans une cellule électrochimique, en fonction de la fréquence. En effet, les phénomènes rapides comme les transferts d'électrons se réalisent

aux hautes fréquences, alors que les phénomènes lents tels que les transferts de masses et la diffusion se produisent aux basses fréquences.

IV.3. Modélisation électrique

Différents diagrammes impédancemétriques peuvent être modélisés à l'aide d'un circuit électrique équivalent contenant uniquement des capacités et des résistances. Ainsi, le modèle de Randles (Figure 15) est le circuit le plus souvent utilisé pour décrire une cellule électrochimique.

❖ Circuit électrique équivalent

i. Circuit de Randles

Le circuit électrique équivalent le plus couramment utilisé est celui de Randles [298].

Il combine quatre éléments :

- la résistance de la solution (R_s) entre l'électrode de référence et l'électrode de travail : Cette résistance dépend, principalement, de la résistivité de la solution, de la géométrie et de l'aire de l'électrode de travail.
- la capacité de la double couche (C_{dl}) : c'est la capacité interfaciale où a lieu une variation du potentiel électrique entre la surface de l'électrode et l'électrolyte.
- la résistance de transfert de charge (R_{TC}) : c'est la résistance liée au phénomène de transfert de charge lors des réactions d'oxydoréduction à l'électrode de travail.
- l'impédance de Warburg (Z_w) qui existe lorsqu'il y a un couple redox dans la solution, exprimant le mécanisme de diffusion des ions du volume, de la solution à l'interface. Cette impédance dépend de la fréquence de perturbation, le potentiel appliqué et la concentration des espèces diffusantes.

Les paramètres agissant en parallèle (C_{DL} , R_{TC} et Z_w) du circuit équivalent sont introduits, car le courant total traversant l'électrode est la somme du courant capacitif (I_c) et du courant faradique (I_f).

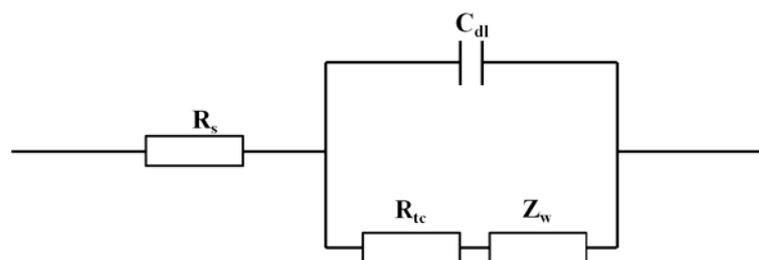


Figure 15 : Circuit électrique de Randles

ii. Diagramme de Nyquist

Compte tenu de l'intervention d'un courant capacitif et d'une résistance R_S à l'interface électrolyte/électrode, le paramètre mesurable est l'impédance totale. Le diagramme de Nyquist (Figure 14) du circuit de Randles comprend un demi-cercle exprimant à la résistance de transfert de charge (R_{TC}) et la capacité de la double couche C_{DL} .

Aux basses fréquences, l'impédance de Warburg est prédominante, et le tracé devient linéaire avec une pente égale à l'unité. Ainsi, la fréquence correspondante au sommet du demi-cercle a pour valeur :

$$F_c = \frac{1}{2\pi R_{TC} C_{dl}}$$

iii. Diagramme de Bode

Le diagramme de Bode est une présentation de comportement fréquentiel d'un système. Son nom vient de celui de son premier inventeur Hendrik Wade Bode.

Ce diagramme est une présentation, à la fois de logarithme de module $|Z_0(\omega)|$ et le déphasage $\varphi(\omega)$ de l'impédance en fonction de logarithme de la fréquence angulaire (Figure 16).

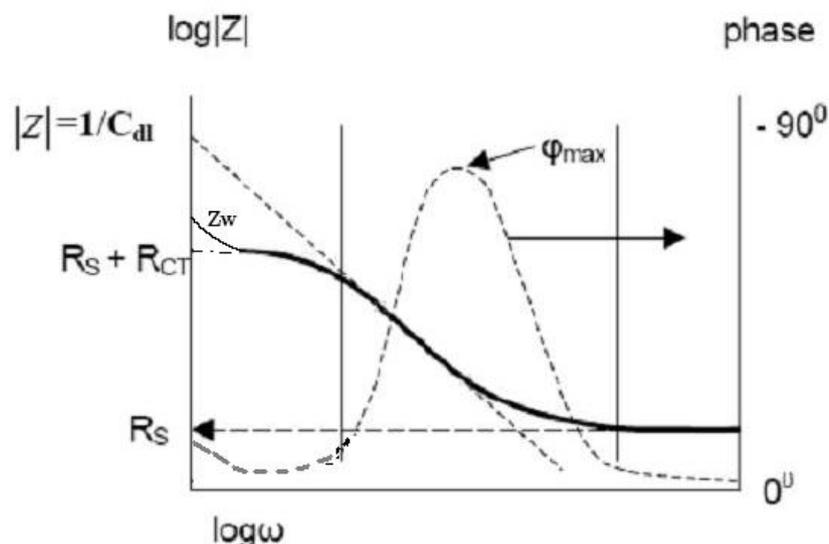


Figure 16 : Diagramme de Bode représentant $\log|Z| = f(\log(\omega))$

Dans le diagramme de Bode, le paramètre de la résistance est exprimé par un trait horizontal, avec $\varphi(\omega)$ est constant égal à 0, alors R_S et $R_S + R_{TC}$ peuvent se déterminer à partir du diagramme de Bode lorsque, respectivement, $\omega \rightarrow 0$ et $\omega \rightarrow \infty$, alors qu'une pure capacité se traduit par une ligne droite de pente -1 et de $\varphi(\omega) = -90^\circ$. La valeur de la capacité est

déduite par extrapolation de la ligne droite jusqu'à $\omega \rightarrow 1$. La valeur de Z trouvée est bien l'inverse de la capacité.

Pour conclure, il est clair que les possibilités d'immobilisation covalente de biorécepteurs sur des substrats solides sont nombreuses, dépendant essentiellement du type de surface, du type de transduction et de la nature des biorécepteurs. Cependant, malgré les optimisations possibles des couches pour la réduction des interactions non-spécifiques (augmentant la sensibilité de la reconnaissance), le contrôle de l'orientation des récepteurs reste un problème à résoudre pour augmenter la capacité de la bio-reconnaissance. Cela montre les efforts à fournir pour le développement des couches où tous les biorécepteurs restent actifs.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Introduction

La mise en évidence de traitement de surface de biocapteur, ses propriétés physicochimiques, ainsi que sa compatibilité envers l'entité à détecter n'est pas une tâche aisée. Des étapes primordiales de la mise au point de biocapteur, passent d'abord par différentes techniques de caractérisation de surface. Les surfaces et les interfaces ont un rôle important dans l'élaboration des systèmes utilisés dans différents domaines. Il faut donc connaître, en premier lieu, les caractéristiques de la surface, permettant de déduire la nature des entités de fonctionnalisation à utiliser et d'aboutir à la stratégie d'immobilisation de biorécepteurs.

Actuellement, un grand intérêt est porté sur diverses stratégies d'immobilisation des biorécepteurs pour répondre aux attentes de secteur de contrôle environnemental, en arrivant à un seuil limite très bas de l'entité à détecter.

Le choix d'une telle technique de caractérisation est fortement proportionnel au type de l'échantillon à détecter ainsi que de l'information que l'on désire avoir.

L'isolement de *L. pneumophila* à partir des échantillons environnementaux est souvent difficile en raison de la présence des bactéries hétérotrophes associées [112]. Afin d'évaluer si nous pouvions détecter la présence de *L. pneumophila* avec plus d'efficacité, nous avons donc utilisé deux versions de capteur fonctionnalisés par deux silanes différents.

Ce travail est donc consacré à l'élaboration de deux immunocapteurs pour la détection et la quantification de *L. pneumophila* dans les échantillons environnementaux. Ces immunocapteurs ont été élaborés en immobilisant un anticorps monoclonal anti-*L. pneumophila* (DP-Lp1-O2) sur des électrodes d'ITO fonctionnalisées par différentes monocouches auto-assemblées (SAMs). Des techniques microscopiques ainsi que physicochimiques ont également été utilisées pour la caractérisation de l'assemblage progressif des immunocapteurs.

I. Matériel biologique

Dans cette étude, nous avons utilisé une souche bactérienne sauvage de *Legionella pneumophila* sg1 (souche WDCM 00107) (isolée au laboratoire d'hygiène Sousse, Tunisie) et une souche bactérienne de *L. pneumophila* génétiquement modifiée (souche 008) au GIMAP produisant la GFP (Green Fluorescent Protein). Les bactéries *Pseudomonas aeruginosa*

(isolée au laboratoire d'hygiène Sousse, Tunisie), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25 923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29 212) et *Escherichia coli* (ATCC 25 922), qui sont des bactéries co-existantes avec *Legionella pneumophila* dans les échantillons réels, ont été utilisées pour la vérification de la spécificité de nos immunocapteurs.

Les mesures électrochimiques de performance des capteurs ont été effectuées à l'aide de souches bactériennes sauvages isolées et identifiées au CHU FARHAT HACHED à Sousse, Tunisie. Pour la caractérisation microscopique, la cytométrie en flux, la q-PCR et la co-culture sur amibes, nous avons utilisé une souche de *L. pneumophila* 008 GFP, fournies par le GIMAP (Saint Etienne, France).

D'une façon générale, *L. pneumophila* est mise en suspension dans de l'eau physiologique (NaCl ; 9 g.L⁻¹) pour obtenir une suspension mère (DO_{600nm}=0.2). Des dilutions décimales en cascade de suspension bactérienne ont été préparées afin d'obtenir des gammes de dilution de 10⁸ jusqu'à 10¹ UFC/mL de *L. pneumophila*.

Plus tard, pour avoir des formes viables non cultivables de *L. pneumophila*, nous avons appliqué un choc thermique (pour mimer le stress imposé aux légionelles dans les réseaux puisqu'un tel traitement thermique est recommandé par l'Organisation Mondiale pour la Santé) de 70 °C pendant 30 min dans un bain marie, pour la suspension mère de 10⁸ UFC/mL.

Pour la caractérisation microscopique, la souche de *L. pneumophila* 008 modifiée génétiquement par une protéine fluorescente GFP, lorsqu'elle est excitée sous les U.V, réémet une lumière verte à une longueur d'onde de 498 nm. Ceci rend ainsi la bactérie plus facilement détectable.

II. Méthodes microscopiques

Les techniques de caractérisation microscopique ont été effectuées à Saint-Etienne au sein du laboratoire Hubert Curien et de Groupe Immunité des Muqueuses et des Agents Pathogènes (GIMAP).

II.1. Microscope à fluorescence

II.1.1. Principe

La microscopie à fluorescence joue le rôle d'un outil d'analyse combinant les propriétés loupe de microscope optique avec visualisation de la fluorescence.

La fluorescence peut être définie comme un processus de luminescence qui permet à une molécule fluorescente (dite fluorophore) d'absorber l'énergie lumineuse, à une certaine

longueur d'onde initiale, pour la réémettre à une longueur d'onde plus grande et passer à un état d'énergie plus faible (loi de Stokes), ceci après un certain temps qui correspond à la durée de vie de la fluorescence.

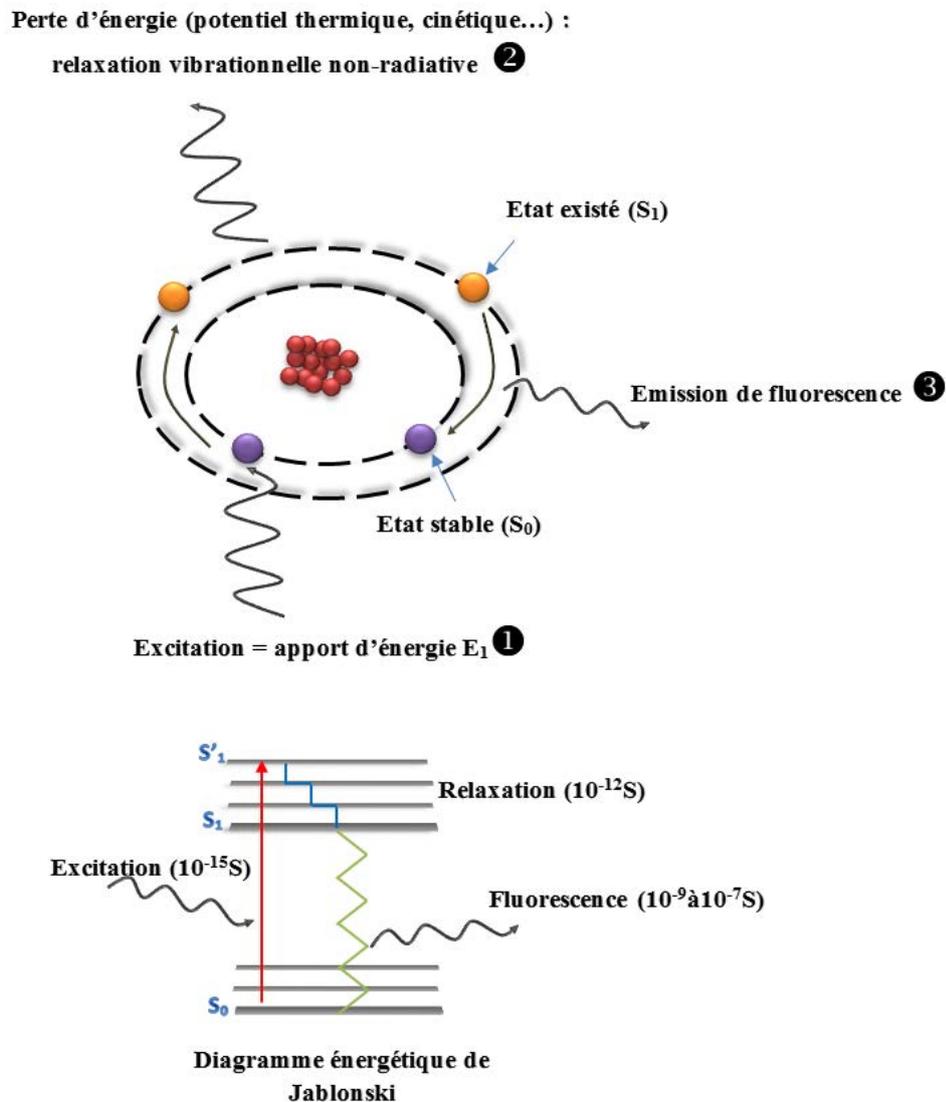


Figure 17 : Principe de la fluorescence et diagramme de Jablonsky. La flèche rouge indique le processus d'absorption, la flèche bleue celui de la relaxation non-radiative dans l'état excité et la flèche verte exprime la fluorescence

Le phénomène de la fluorescence peut être décrit en trois étapes avec des intervalles de temps caractéristiques bien déterminés (Figure 18) : excitation, relaxations vibrationnelles et émission de fluorescence. La molécule fluorescente s'excite par absorption de photons. L'intervalle de temps caractéristique de cette étape est de l'ordre de la femtoseconde (10^{-15} s) alors que les intervalles de temps associés aux processus des relaxations vibrationnelles sont

de l'ordre de la picoseconde (10^{-12} s). L'étape finale de l'émission de fluorescence s'effectue sur des intervalles de temps plus longs de l'ordre de nanoseconde (10^{-9} s).

Une molécule fluorescente (fluorophore) passe par différents états électroniques excités. Chaque état est divisé en différents niveaux d'énergie vibrationnels liés au noyau atomique et les orbitales de liaison. Le diagramme énergétique de Perrin-Jablonski (figure 17) [299 ; 300] décrit ces niveaux énergétiques impliqués dans les phénomènes d'absorption ainsi que d'émission de fluorescence. L'énergie d'excitation absorbée par la molécule fluorescente crée un nouvel état électronique excité S'_1 . Une partie de cette énergie est échangée dans des interactions avec le milieu pendant une phase de relaxation vibrationnelle, pour passer à un état d'énergie S_1 . Le fluorochrome excité émet un photon, pour retourner à son état d'énergie initial S_0 (Figure 17).

Le phénomène d'absorption d'un photon est suivi par une relaxation non-radiative (cascade de plusieurs états énergétiques couplés) vers un niveau vibrationnel le plus faible du premier état excité. Cette relaxation se déroule, à l'échelle pico- voire femtoseconde, au niveau de la molécule après sa photoexcitation à partir de son état énergétique initial S_0 vers l'état énergétique S'_1 le plus élevé du premier état excité. Cette étape est caractérisée par une stabilisation énergétique. Les procédés responsables de cette étape de relaxation sont soit : (i) intramoléculaires tels que la relaxation électronique et/ou vibrationnelle, le transfert de charge, et le changement de conformation ; ou (ii) intermoléculaires tels que la rupture et formation des liaisons hydrogènes, et le passage de proton de soluté vers le solvant. Le passage de niveau S_1 le plus bas de l'état excité, vers le niveau fondamental S_0 peut avoir lieu avec une émission de lumière, dans ce cas-là on parle de fluorescence, tel que la longueur d'onde d'absorption est plus faible que la longueur d'onde d'émission.

La technique de la microscopie à fluorescence est majoritairement appliquée pour la caractérisation des échantillons biologiques. En effet, les molécules fluorescentes qui peuvent être utiles sont les protéines, les petites molécules aromatiques et les nanocristaux de semiconducteurs. Au cours de notre étude, la protéine GFP est utilisée en tant que molécule fluorescente.

L'utilisation des molécules fluorescentes présente plusieurs avantages tels que par exemple la compatibilité *in vivo*, la non-toxicité, ainsi que la spécificité du marquage.

II.1.2. Dispositif expérimental

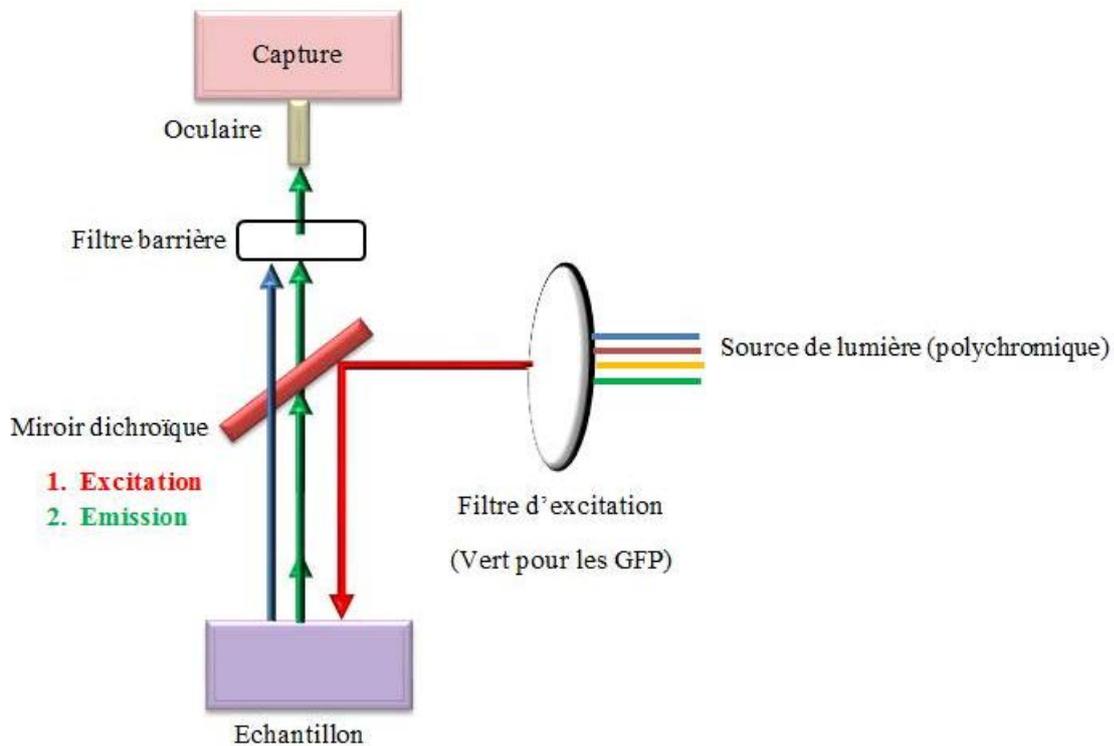


Figure 18 : Principe du microscope à fluorescence à angle droit

Cette technique a été utilisée pour contrôler la répartition des bactéries sur la surface de notre immunocapteur.

La molécule fluorescente (fluorophore) GFP absorbe et émet une lumière, généralement de l'ultraviolet, à une longueur d'onde précise. Cette molécule GFP, excitée sous les U.V, réémet une lumière verte à une longueur d'onde de 498 nm et rend ainsi la bactérie plus facilement détectable. Le principe de cette technique, peut être expliqué par le rôle de différents éléments (Figure 18). La source de lumière est constituée d'une lampe capable d'émettre plusieurs lumières avec plusieurs longueurs d'ondes. Le spectre lumineux émis est ensuite filtré en une longueur d'onde bien déterminée par un filtre d'excitation. Le faisceau est ensuite réfléchi vers l'échantillon à observer grâce à un miroir dichroïque, ce qui permet alors l'excitation de l'échantillon. Ce dernier émet une lumière (réponse de l'excitation de la molécule) qui sera sélectionnée par un filtre barrière (ou filtre d'émission). La lumière émise est de longueur d'onde supérieure à celle d'excitation. Le filtre barrière est capable de séparer les photons d'émission des photons d'excitation. Et finalement, un capteur transforme le signal lumineux en signal électrique [301].

Au cours de cette étude, on a utilisé un microscope à fluorescence qui est un Nikon Eclipse Ti-S au sein du laboratoire GIMAP.

II.2. Microscope à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique (AFM) est un instrument analyseur de la surface de l'échantillon, à l'échelle atomique, selon deux modes :

- En mode d'imagerie topographique, tel qu'une pointe balaie la surface de l'échantillon, produisant une image en 3D de la structure de surface.
- En mode de spectroscopie des forces, pour mesurer les forces d'interaction inter et intramoléculaires, en fonction de la distance pointe et surface de l'échantillon.

II.2.1. Principe

Le principe de cette technique est basé sur l'interaction entre une pointe très fine d'un levier flexible (de dizaines de nanomètres ou même moins) et la surface de l'échantillon sur laquelle elle oscille avec une très faible force (de l'ordre de nN). Alors, la déviation de la console est détectée, permettant le contrôle de la pointe ainsi que l'enregistrement des forces interatomiques (Van der Waals, électrostatiques, frictions) entre la pointe et l'échantillon.

L'image de la topographie de surface de l'échantillon est présentée suite aux mouvements du scanner sur l'axe Z.

II.2.2. Dispositif expérimental

L'architecture principale d'un AFM est présentée dans la figure 19.

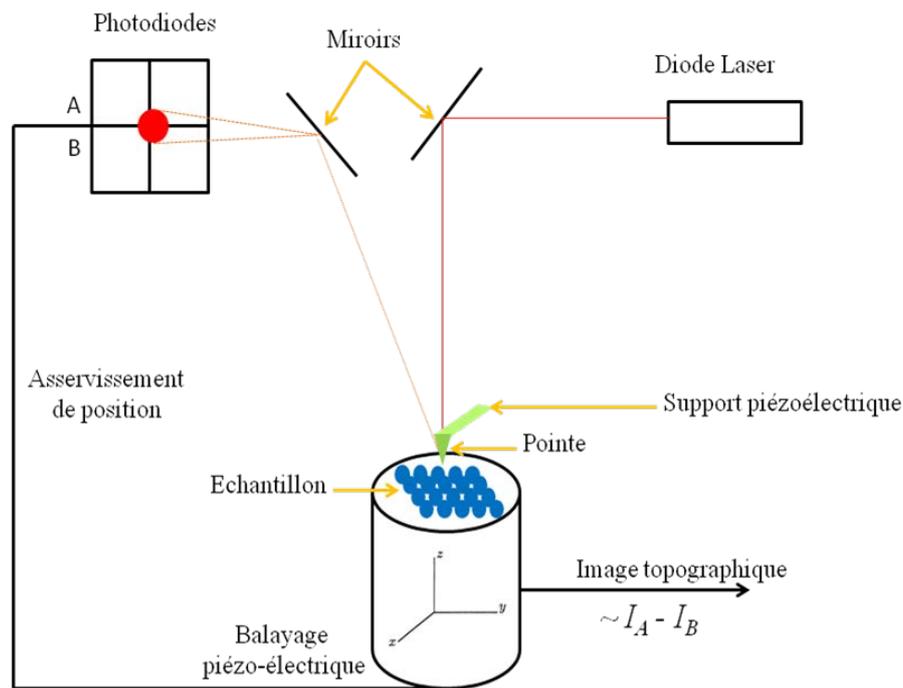


Figure 19 : Architecture principale d'un AFM

Les composants les plus importants dans l'exploitation de l'AFM sont le scanner, le capteur des forces et le dispositif de commande.

- Le scanner :

Il est composé d'un tube piézoélectrique, en céramique. Ce composant permet le déplacement de levier sur les axes X et Y (pour la numérisation de l'échantillon) et l'axe Z (pour le contrôle de la distance pointe-échantillon). La position et la vitesse de balayage de scanner sont produites par un générateur de signal, qui de ce fait, est capable de créer des rampes de tension.

- Détection de déviation de cantilever :

Le déplacement de cantilever sert à mesurer les interactions entre la pointe et la surface de l'échantillon. Ce qui signifie que les capteurs des forces doivent être capables de détecter ces légers mouvements de cantilever.

Dans la conception originale de l'AFM, Binnig et al. en 1986 [302], ont utilisé une sonde à effet tunnel, pour détecter le déplacement, en mesurant un courant résultant à effet tunnel entre la pointe et le cantilever. Plus tard, plusieurs méthodes ont été conçues, y compris l'évaluation de la diode laser et la détection de faisceau optique. Cette méthode est la plus utilisée dans les systèmes commercialisés. En effet, un faisceau laser est focalisé au-dessus de

la pointe, et ensuite réfléchi sur un miroir, qui le dirige vers un photo-détecteur (ou photodiode) à quatre quadrants sensibles à la position de la sonde.

La déviation de cantilever pendant le balayage, permet un changement progressif de la position de laser sur la photodiode, pour atteindre chaque fois un quadrant. Ainsi, les forces interatomiques (de Van Der Waals) entre la pointe et l'échantillon sont mesurées optiquement par la photodiode.

- Les principales modes de balayage :

Lors de l'approche de la pointe vers la surface, et la déviation de cantilever, des forces se produisent, qui sont généralement des forces de Van Der Waals, des forces répulsives, ou même des forces adhésives et capillaires.

En s'éloignant de la surface de l'échantillon, des forces de Van Der Waals s'appliquent à la pointe qui sera tirée de nouveau vers la surface et il résulte une flexion du cantilever. Dès que la distance pointe-surface commence à diminuer, des forces répulsives s'appliquent, et le cantilever se plie dans le sens inverse. Donc, Il y aura une pression sur la surface de l'échantillon. Dès que le cantilever commence à s'éloigner de la surface, la force va diminuer progressivement jusqu'à atteindre le régime attractif de nouveau.

Selon le profil force-distance, trois différents modes de balayage peuvent être envisagés tels que mode contact, mode non-contact, et mode contact intermittent ou « tapping ». La figure 20 représente la courbe des forces qui peuvent être appliquées par la pointe dans les différents modes de balayage.

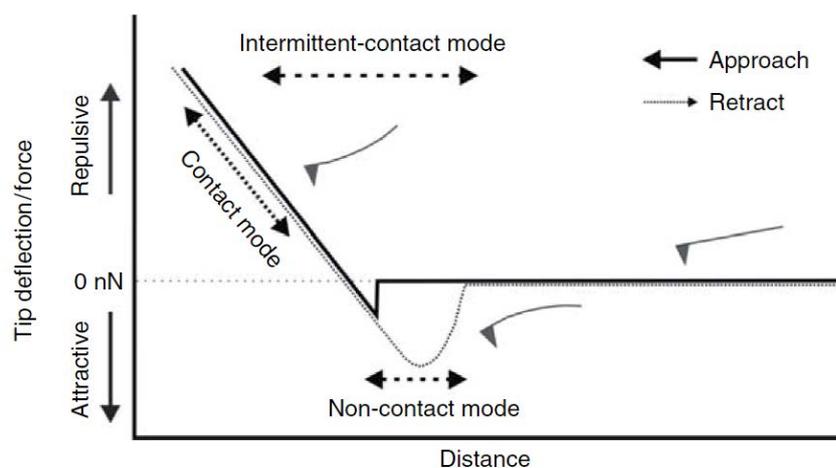


Figure 20 : Présentation de la courbe des forces appliquées par la pointe selon les différents modes de balayage

- ✓ Mode contact : comme son nom l'indique, ceci est quand la pointe est en contact direct avec la surface, et dans ce cas l'AFM fonctionne dans le régime répulsif. La force de la pointe reste constante durant son balayage de la surface.
- ✓ Mode non-contact : ce mode est essentiellement utilisé sous vide. L'AFM fonctionne dans le régime attractif. Ce mode permet la séparation de l'effet des forces conservatives et dissipatives.
- ✓ Mode « tapping » : Ce mode est de loin le plus utilisé, consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance (de l'ordre de la centaine de kHz), avec une certaine amplitude, entre 1 et 100 nm, pour se déplacer de la zone où il n'y pas de forces vers le régime attractif et ainsi que le régime répulsif.

Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude diminue (à cause de changement de la fréquence de résonance). La rétroaction se fait alors sur l'amplitude d'oscillation du levier. Ainsi, ce mode est également utilisé pour détecter le déphasage.

Dans ce travail, on a utilisé un microscope à force atomique qui est un Agilent 5500 (Agilent, Les Ulis, France). Les images AFM sont réalisées en mode tapping, et traitées par le logiciel Gwyddion.

II.3. Microscope confocal (CLSM)

II.3.1. Principe

En général, le contraste de l'image résulte de la réflectivité de surface. Le microscope optique classique est capable de donner une image plate, révélant des informations sur les dimensions latérales (les axes X et Y) de l'échantillon à analyser, mais pas de dimensions axiales (l'axe Z).

La technique de la microscopie confocale est largement utilisée en biologie. Elle consiste à explorer l'échantillon point par point, suite à la focalisation d'un faisceau à l'aide d'un dispositif d'illumination qui sert à scanner cet échantillon dans les trois dimensions de l'espace. Le signal lumineux émis par chaque point est ensuite récupéré sur un photomultiplicateur [303 ; 304].

II.3.2. Dispositif expérimental

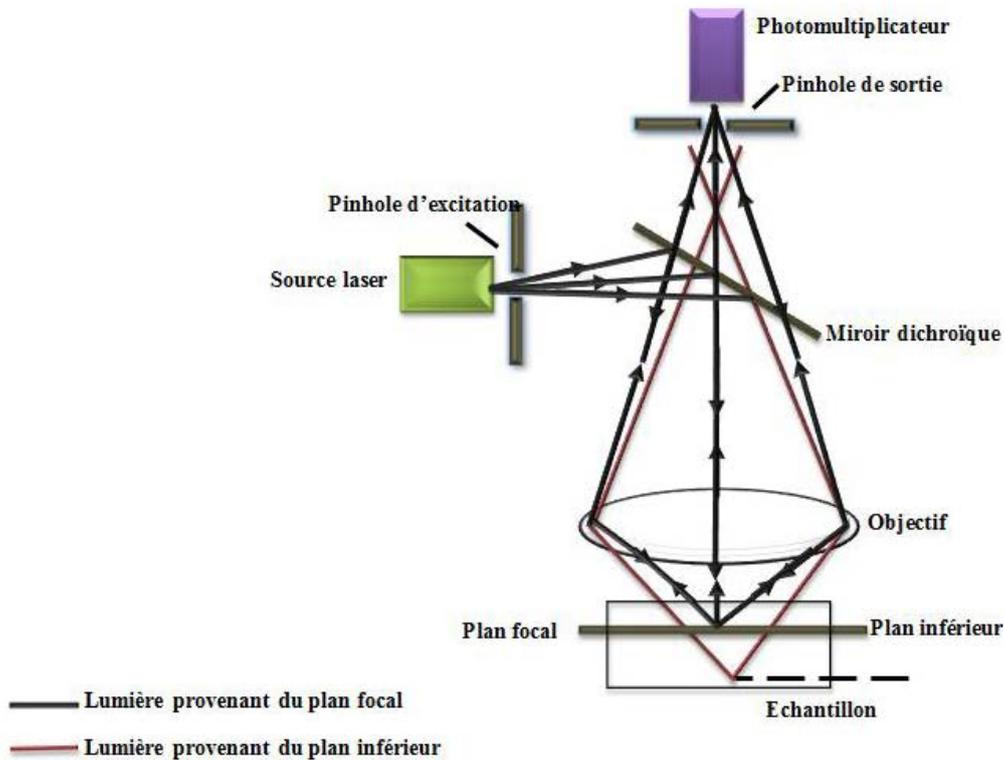


Figure 21 : Principe du microscope confocal (CLSM)

Un diaphragme est situé devant le photomultiplicateur (Figure 21) pour arrêter le passage de tout signal qui ne provient pas du plan focal de l'échantillon [305]. Le signal récupéré est amplifié par le photomultiplicateur, traité afin d'éliminer le bruit, ensuite numérisé [306]. Des miroirs de déflexion de source laser servent à balayer le champ analysé, sur les axes X et Y, point par point, afin de construire l'image. L'échantillon est placé sur une platine motorisée qui lui déplace suivant l'axe Z, permettant ainsi la contribution de plusieurs plans optiques dans l'épaisseur de l'échantillon.

La technique de microscopie confocale permet l'obtention des coupes optiques virtuelles de l'échantillon, sur le plan (X, Y) ainsi que le plan (X, Z) qui est parallèle à l'axe optique, pour construire des images tridimensionnelles [305].

La microscopie confocale est employée dans divers domaines tels que la biologie cellulaire, l'immunologie, cancérologie, physique des matériaux [307].

En biologie, la microscopie confocale fluorescente est basée sur l'utilisation des moyens de marquages (à l'aide par exemple de produits fluorescents), permettant l'observation des structure 3D remarquables.

Cette technique est avantagée par une résolution latérale et axiale importante, permettant la construction des images en 3D de la bactérie sur la surface (révélant la planification de la surface), par rapport à la microscopie optique classique. Mais, son inconvénient reste sa lenteur pour donner une image tridimensionnelle (environ 1h d'exposition des molécules fluorescentes au laser, ce qui peut causer la perte de fluorescence de quelques bactéries au cours du temps).

Les différentes caractérisations par la microscopie confocale, ont été réalisées au Centre de microscopie confocale multiphotonique de l'Université de Saint-Etienne (France) en utilisant un microscope confocal à balayage laser TCS-SP2 inversé (Leica Microsystems, Nanterre, France). Le dispositif est constitué d'une source de lumière (laser de longueur d'onde 488 nm), un système de miroirs (miroir dichroïque, et miroirs de balayage) permettant de réfléchir et déplacer le faisceau de lumière d'excitation sur l'échantillon à imager. Ce dernier va émettre la lumière d'excitation, pour qu'elle soit détectée par un détecteur.

III. Cytométrie en flux (FCA)

III.1. Principe

La cytométrie en flux (FCA) est une technique d'analyse qualitative et quantitative des particules en suspension. Chaque particule fluorescente excitée par un faisceau lumineux, émet une lumière qui peut être analysée et mesurée par l'ordinateur.

III.2. Dispositif expérimental

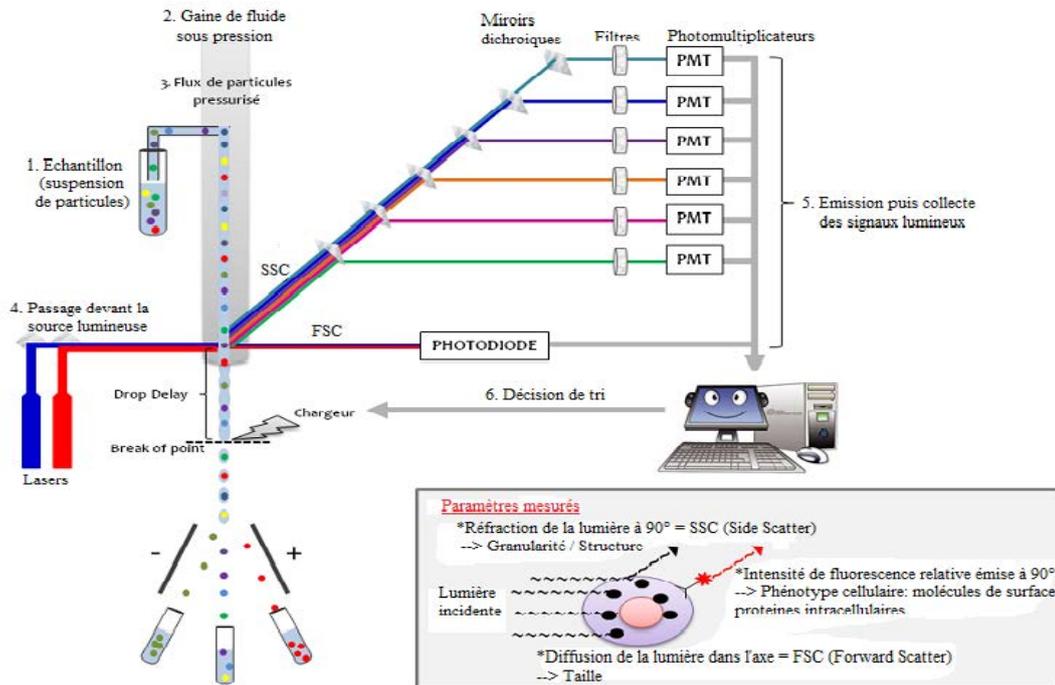


Figure 22 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux

La technique de cytométrie en flux a été effectuée en utilisant un instrument FACSCalibur BD (Becton Dickinson Biosciences, Le Pont-de-Claix, France).

Des fluorochromes ont été incubés avec la suspension bactérienne, avant et après traitement thermique pour assurer le marquage spécifique de structures cellulaires, tels que le Syto9 de couleur verte qui agit avec les cellules à membrane intacte (vivante) et le PI (propidium iodide) de couleur rouge qui agit avec les cellules à membrane endommagée.

La suspension cellulaire est absorbée par un injecteur vers un centre d'une buse, dans laquelle un liquide de gaine, qui a la même densité que cette suspension, est poussé avec une pression importante. Une source lumineuse (laser d'argon à 488 nm) excite les cellules marquées par les fluorochromes. Ces derniers permettent aux cellules d'émettre des lumières monochromatiques fluorescentes. Ces lumières sont séparées par des filtres, et collectées par des photomultiplicateurs (Figure 22). Les résultats sont amplifiés et traités par un ordinateur. Les données se présentent sous forme de graphique auxquels s'ajoutent des statistiques des populations bactériennes.

IV. PCR quantitative (q-PCR) :

Cette technique en temps réel, permet de suivre la réaction d'amplification d'ADN de *L. pneumophila* (quel que soit leur état physiologique) en fonction du nombre de cycles effectués. La technique de PCR quantitative en temps réel a été utilisée pour contrôler la qualité des concentrations des suspensions de *L. pneumophila* GFP (Lp1 008) (vérification des concentrations totales en *L. pneumophila*) avant et après le traitement thermique.

La technique de la q-PCR a été appliquée sur des suspensions de concentrations décroissantes de *L. pneumophila* (de 10^8 à 10^1 UFC/mL). La quantification, comme décrite par Allegra et al., a été faite en ciblant une séquence de gène GFPmut2 [308]. Les amorces sens-GFP et anti-sens-GFP utilisées étaient 5'-AGAGTGCCATGCCCGAAGGT-3' et 5'-AAGGACAGGGCCATCGCAA-3' respectivement. L'extraction d'ADN a été effectuée avec le kit NuCleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) en suivant les instructions de fabricant. La q-PCR était réalisée sur un automate ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), en utilisant le 2X Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) [308].

Les cycles de PCR employés étaient comme suit : une étape initiale de dénaturation de 15 min à 95°C puis de 50 cycles d'amplification composés d'une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C, une minute d'hybridation et élongation à 60°C. La fluorescence a été mesurée à la fin de chaque étape d'élongation (fin de cycle). A la fin de la réaction (après les 50 cycles d'amplification), une courbe de fusion est obtenue pour vérifier les dimères d'amorces ou d'autres amplifications non spécifiques. Chaque amplification d'échantillon a été réalisée en double. Les résultats de la q-PCR ont été analysés en utilisant le Sequence Detection Software en version 1.4 (ABI 7500 System Software, Applied Biosystems). Ces résultats ont été exprimés en unités génomique (GU) de séquence de GFP amplifiée [308].

Le principe de la PCR quantitative en temps réel (utilisant le SYBR Green) peut être résumé par la mesure de la fluorescence en fin de l'élongation de brin d'ADN nouvellement synthétisé. Le nombre de cycles nécessaire pour avoir une fluorescence dépend du nombre des molécules d'ADN cibles initialement présentes. Plus le nombre de molécules cibles est élevé à l'origine dans l'échantillon, moins il faudra de cycles pour arriver à un point auquel le signal de la fluorescence est significativement supérieur au bruit de fond. La valeur de ce point (cycle seuil - Ct) est présentée par l'intersection de la courbe de fluorescence avec la ligne de bruit de fond. En effet, le concept de point Ct intervient dans la description de la précision et la reproductibilité de la technique PCR.

Un suivi de la fluorescence au cours du temps montre une augmentation de cette fluorescence proportionnelle au nombre de brins d'ADN cibles en trois phases :

- Phase de bruit de fond : une quantité insuffisante de molécule cible amplifiée pour une fluorescence supérieure au bruit de fond.
- Phase exponentielle : la quantité de molécule cible amplifiée génère un signal fluorescent qui dépasse le seuil limite de détection de l'appareil, ensuite le nombre de molécule cible amplifiée double à chaque cycle de la PCR si celle-ci a une efficacité de 100%. En coordonnées logarithmiques, la phase exponentielle est une phase linéaire représentée par une droite dont le R^2 doit être de 1.
- Phase de saturation (ou de plateau) : les composants disponibles de la réaction (tel que par exemple le nombre d'amorces sens ou anti-sens GFP) deviennent limitant. La réaction ne permettra plus une amplification exponentielle.

V. Co-culture sur *Acanthamoeba polyphaga*

La technique de la co-culture sur amibes, a été utilisée pour valider que les formes VBNC générées après traitement thermique (lesquelles étaient déposées sur le capteur en version APTES) étaient susceptibles d'être ressuscitées (après contrôle de leur incapacité à croître sur milieux de culture).

Les amibes (*Acanthamoeba polyphaga*) fournies par le GIMAP, Saint-Etienne, France, qui ont été conservées à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, sont resuspendues dans des flasques de culture cellulaire de 25 cm^2 (BD Biosciences, France) contenant 10 mL de leur milieu de culture PYG (peptone-yeast-glucose broth : 2 % proteose peptone no. 3, 0.1 % yeast extract, 0.1 M glucose, 4 mM MgSO_4 , 0.4 M CaCl_2 , 0.1% sodium citrate, 0.05 M $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{-}6\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mM NaH_2PO_3 , 2.5 mM K_2HPO_3 (pH 6.5)) et cultivées à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 72 h [41]. Arrivées à confluence, les amibes sont décollées des flasques (dépôt sur glace pendant 15 min et agitation contre la paille), et ensuite centrifugées à 6000 rpm pendant 8 min. Le culot est récupéré dans 1.5 mL de PYG. Les amibes sont dénombrées dans une cellule de comptage (Kovaslide) sous un microscope inversé. Les amibes (5.10^5) sont ensuite incubées dans 2 mL de PYG à 30°C pendant 3 jours dans une plaque à 6 puits. Plus tard, le milieu PYG est retiré des puits en faisant attention de ne pas décrocher les amibes (le fond du puits paraît grumeleux). Enfin, les amibes (dans 3 puits) sont infectées par les souches de *L. pneumophila* (5.10^6 UFC/mL). Le premier puits ne contient que les amibes, le deuxième contient des amibes avec des *L. pneumophila* non traitées, et le troisième puits contient des amibes avec des VBNC générées par choc thermiques. Le volume est complété jusqu'à 2 mL avec milieu d'infection PAS sans

antibiotique. Après une incubation de 3 jours à 30°C, le milieu de culture des amibes est retiré des puits, et les amibes (des 3 puits) sont cultivées sur 3 boîtes différentes de GVPC, avec une boîte témoin pour le contrôle négatif, pendant 3 jours à 37 °C.

VI. Techniques de caractérisation physico-chimique des substrats modifiés

Les manipulations électrochimiques sont effectuées au sein du laboratoire de biophysique à la Faculté de Médecine de Monastir, Tunisie.

VI.1. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)

VI.1.1 Principe

Dans ce travail, on a utilisé la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) pour évaluer l'étape de fonctionnalisation de l'électrode d'ITO et la détection des bactéries.

En électrochimie, on s'intéresse souvent aux processus et aux facteurs qui influencent le transport de charge à travers l'interface entre deux phases distinctes chimiquement (électrode et électrolytes). Le plus souvent, l'une des deux phases, de part et d'autre de l'interface étudiée, est un électrolyte dans lequel les charges sont transportées par le mouvement des ions. La deuxième phase est une électrode (ITO), c'est-à-dire une phase dans laquelle le transport des charges a lieu par le mouvement d'électrons.

Dans ce travail nous nous intéressons à l'interface matériau conducteur/électrolyte.

VI.1.2. Dispositif expérimental

Toutes les expériences électrochimiques, la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) et la voltammétrie cyclique, ont été réalisées avec un analyseur d'impédance "Voltalab 40" associé à un Potentiostat PGZ301 avec une cellule électrochimique placée dans une cage de Faraday (Figure 23). Toutes les mesures expérimentales sont réalisées à température ambiante et à l'obscurité dans la cage de Faraday pour éviter les charges photo-induites dans l'électrode de travail.

Pour les mesures d'impédance, cet appareil sert à la fois à générer le signal sinusoïdal avec l'amplitude et la fréquence désirées, et à extraire les parties réelle et imaginaire de l'impédance du système étudié. L'analyseur d'impédance est piloté par un ordinateur à l'aide du logiciel "Volta Master".

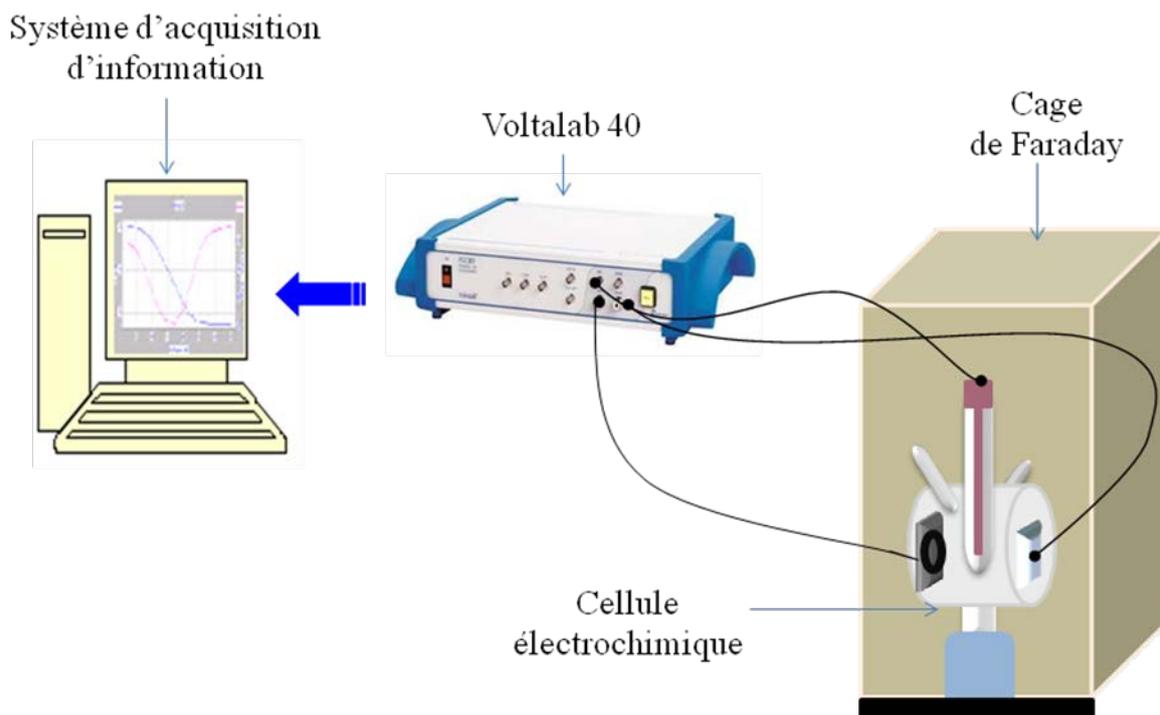


Figure 23 : Montage de mesures électrochimiques

VI.1.2.1. Cellule électrochimique

Pour réussir les mesures électrochimiques, plusieurs modèles de cellules ont été testés ; le dernier mis en jeu est en Pyrex. La cellule est en effet conçue pour assurer une distance constante entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire de platine. La contenance interne est d'environ 5 mL (Figure 24). Dans la partie inférieure de la cellule, on notera, par ailleurs, l'existence de deux ouvertures de positions opposées destinées pour l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire de platine, alors que la partie supérieure de la cellule est munie d'une ouverture consacrée pour l'électrode de référence. La géométrie de cette cellule permet une disposition bien déterminée des trois électrodes. En effet, il est important de maintenir aussi proche que possible l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire, afin d'assurer une densité de courant homogène à l'électrode de travail et de minimiser ainsi le phénomène de la chute ohmique.

Le passage du courant dans la cellule se fait donc à travers l'électrode auxiliaire. Celle-ci a souvent une surface très importante par rapport à celle de l'électrode de travail (au minimum deux fois plus grande) et donc son impédance peut être négligée dans le calcul de l'impédance totale de la cellule.

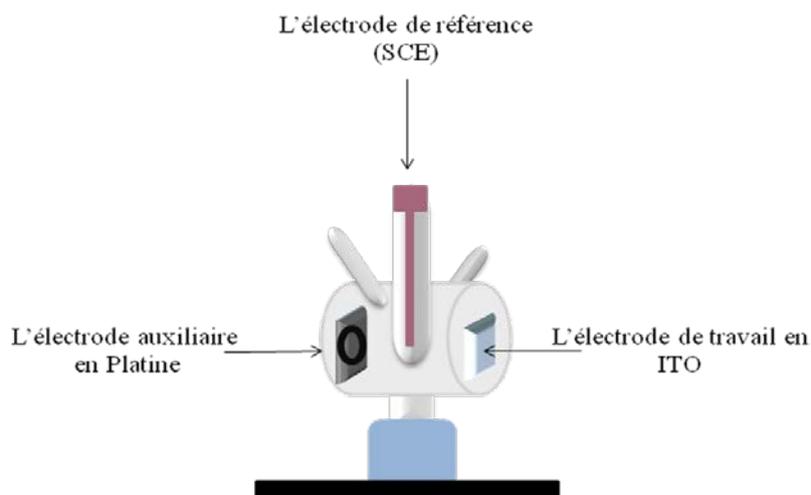


Figure 24 : Schéma de la cellule électrochimique à trois électrodes

Après la fermeture des trous de la cellule électrochimique avec du parafilm, une solution de piranha (H_2SO_4 (97%)/ H_2O_2 (30%) ; 3 v/v) est versée dans la cellule pour la nettoyer. La cellule est ensuite rincée abondamment avec de l'eau distillée et laissée sécher à l'étuve.

VI.1.2.2. Electrode de travail

Des plaquettes de verre revêtues d'indium-tin-oxyde (ITO), ont été utilisées comme électrodes de travail sur lesquelles on examine les processus électrochimiques à explorer.

Avant la modification, pour enlever les résidus organiques et minéraux de surface, les électrodes d'ITO ont été nettoyées dans une solution d'acétone, éthanol et H_2O ultra-pure, respectivement, pendant 15 min sous ultrasons. Pour planifier la surface, les électrodes ont été trempées dans une solution de KOH de concentration 5 M pendant 1 h, à température ambiante, suivi d'un rinçage avec de l'eau ultra-pure pendant 10 min avec sonication. Ensuite, les électrodes ont été immergées dans une solution de RCA (NH_4OH (28%), H_2O_2 (30%), H_2O ; 1:4:20 v/v) pendant 30 min à 60 °C pour y créer des groupements OH, puis rincées avec de l'eau ultra-pure pendant 10 min à l'aide des ultrasons. Une solution de piranha a été appliquée pendant 1 min, suivi d'un rinçage avec de l'eau ultra-pure pendant 10 min et de l'éthanol pendant 5 min, avec sonication, et séchage avec un flux d'azote avant de passer à l'étape de fonctionnalisation.

VI.1.2.3. Electrode de référence

Dans ce travail on a utilisé une électrode de référence au calomel saturé (ERCS) (Figure 25). Elle est constituée d'une électrode de mercure en contact avec du chlorure mercurieux (Calomel) et du chlorure de potassium saturé : $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$.

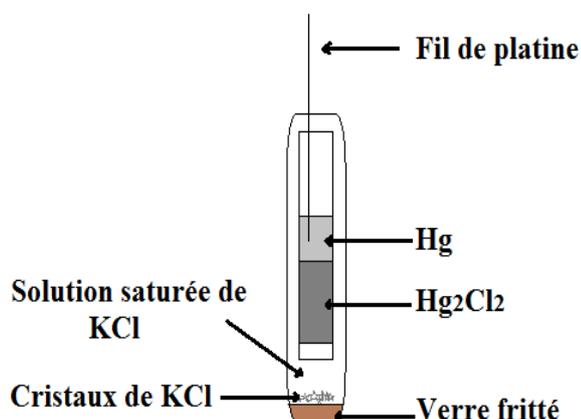


Figure 25 : Electrode de référence au calomel saturé (ERCS)

VI.1.2.4. Electrode auxiliaire

L'électrode auxiliaire (dite aussi contre-électrode) est usuellement en platine et possède une large surface (de l'ordre de 0.45 cm^2) par rapport à l'électrode de travail. Elle assure le passage du courant dans la cellule.

La contre-électrode et les joints toriques sont nettoyés avec de l'acétone puis avec de l'éthanol sous ultrasons pendant 20 minutes. Puis elles sont rincées soigneusement avec de l'eau ultra-pure et séchées sous flux d'azote.

VI.2. Voltamétrie cyclique (CV)

La voltamétrie est une technique d'électroanalyse basée sur la mesure du flux de courant résultant de la réduction ou de l'oxydation des composés tests présents en solution sous l'effet d'une variation contrôlée de la différence de potentiel entre deux électrodes (travail et contre électrode).

Pour le choix adéquat de potentiel de travail, on a tracé les courbes de voltamétrie cyclique avec le couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ à 5 mM dans du PBS 0.16 M afin de contrôler la formation des différentes couches constituant le biocapteur.

VI.3. Mesure de l'angle de contact

VI.3.1. Principe

L'étude de la mouillabilité d'une surface permet une évaluation directe des propriétés hydrophobes/hydrophiles de la surface de substrat.

L'angle de contact est mesuré lorsqu'une goutte de liquide sonde, l'eau, est déposée sur la surface de l'électrode, par mesure de l'angle de la tangente de cette goutte avec la surface de l'électrode.

III.3.2. Dispositif expérimental

En pratique, une goutte de 2 μL de liquide sonde, en général de l'eau ultra-pure, est déposée à l'aide d'une micro-seringue sur la surface de l'échantillon à analyser (Figure 26). La mesure de l'angle se fait via une caméra Digit Drop. Un logiciel permet de numériser le contour de la goutte par traitement de l'image. L'angle de contact θ est déterminé à partir de l'enregistrement de la cinétique d'étalement de la goutte après le premier contact durant environ 15 secondes.

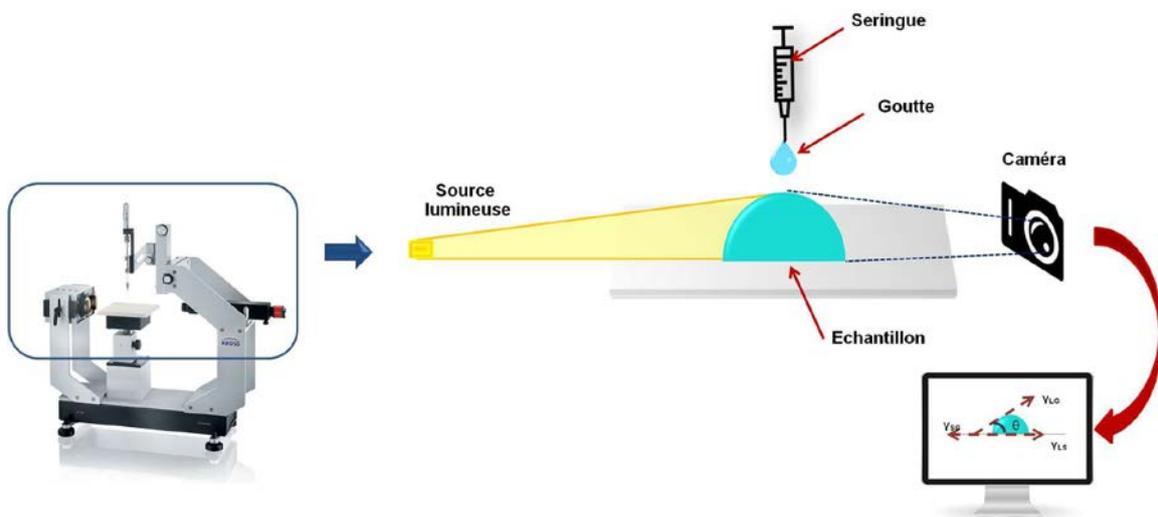


Figure 26 : Appareil Digit Drop et principe de mesure de l'angle de contact

Le caractère hydrophile d'une surface est généralement décrit en termes de mouillabilité avec l'eau.

La mouillabilité est caractérisée par l'angle de contact (θ) du liquide sur le solide qui dépend de trois tensions superficielles : Liquide-Solide, Solide-Gaz et Liquide-Gaz représentées respectivement par γ_{LS} , γ_{SG} , γ_{LG} (Figure 27).

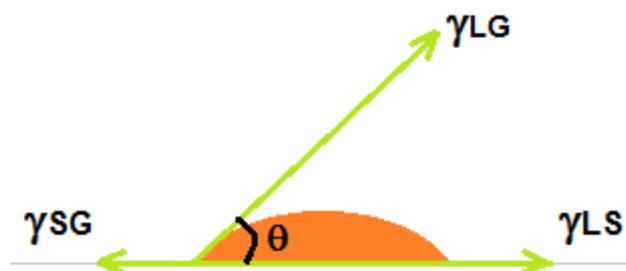


Figure 27 : Forces appliquées sur une goutte d'eau posée sur un support solide

A l'équilibre, la somme des trois forces appliquées à la surface est nulle. Ce qui conduit à la relation de Young-Dupré :

$$\gamma_{LG} \cos \theta_E = \gamma_{SG} - \gamma_{LS}$$

Cette relation n'est vraie que dans le cas où la goutte est en équilibre avec le support sur lequel elle est posée, celui-ci doit être lisse, homogène et plan. Elle présente un angle d'équilibre avec ce support noté θ_E .

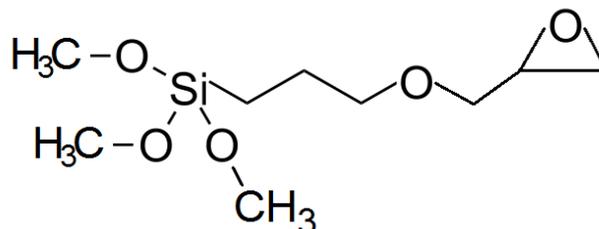
Dans notre étude, une goutte d'eau ultra-pure est déposée sur la surface de notre électrode ITO, avant et après fonctionnalisation.

VII. Méthodes de fonctionnalisation de surface d'ITO par les monocouches auto-assemblées (SAMs)

Au cours de cette thèse, deux fonctionnalisations différentes ont été investiguées. L'intérêt était d'évaluer l'impact de la fixation de l'anticorps, sur la détection de *L. pneumophila*, selon son orientation sur le capteur (il est préférable de maintenir les deux valences réactionnelles de l'anticorps disponibles puisque cela est susceptible de permettre la « capture » de plus de bactéries pour une même concentration déposée sur l'ITO). Il peut ainsi être escompté une meilleure détection de *L. pneumophila* notamment pour des échantillons fortement concentrés (alors qu'un capteur qui aurait mobilisé une valence réactionnelle de l'anticorps pour sa fixation sur l'ITO serait potentiellement plus vite saturé à concentration bactérienne équivalente).

VII.1. Epoxysilane

L'époxysilane (structure ci-dessous) utilisé est le (3-Glycidoxypropyl)triméthoxysilane (GPTMS) :



Dans la littérature, le GPTMS a été largement utilisé dans l'élaboration des biocapteurs [309 ; 310 ; 311 ; 312 ; 313 ; 314 ; 315].

C'est un époxysilane de formule chimique $C_9H_{20}O_5Si$, de chaîne carbonée à 9 atomes de carbone qui permet la fixation de l'anticorps **par son extrémité NH₂** (paratope).

L'électrode d'ITO nettoyée est incubée dans une solution de 2% GPTMS dissoute dans le tétrachlorure de carbone (CCl_4) anhydre, pendant une nuit à température ambiante, permettant la formation des (Self Assembled Monolayers) SAMs d'époxysilane sur la surface de l'électrode d'une façon covalente. Une étape de chauffage des électrodes dans l'étuve à 120°C pendant 2 h est nécessaire pour durcir le silane et éviter la présence d'eau qui pourrait aboutir à la formation d'une couche blanche sur la surface [316]. La dernière étape est l'immobilisation des immunoglobulines (anti-*L. pneumophila*) sur la surface d'ITO-GPTMS pendant 2h à 4 °C.

Les extrémités libres des GPTMS, sont ensuite désactivées par 1% de BSA pendant 30 min à 4 °C pour éviter toute fixation non spécifique.

Des concentrations différentes de bactéries (en UFC/mL) sont incubées sur l'électrode pendant 2 h à température ambiante.

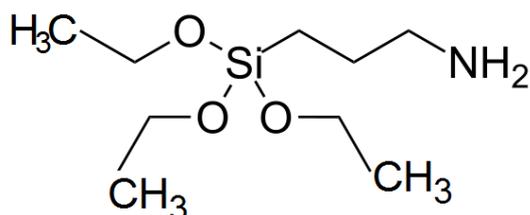
IV.2. Aminosilane

Comme toutes les protéines, une molécule d'anticorps possède des fonctions amines et carboxyles au niveau des chaînes latérales des acides aminés non-terminaux, donc une immobilisation par les fonctions amines et carboxyles de l'anticorps est toujours possible. Il est néanmoins nécessaire d'essayer d'orienter l'anticorps de détection de telle façon que ses extrémités réactives (domaines Fab) soient disponibles pour la capture de *L. pneumophila*. L'orientation de l'anticorps dépend de la nature de la surface à laquelle les molécules seront

immobilisées. Dans le cas de l'immobilisation des anticorps par leurs fonctions terminales amines (utilisation d'époxyxilane de type GPTMS), ceci pourrait bloquer un site de biorecognition de *Legionella* (domaines Fab). De ce fait, il est préférable de favoriser une fonctionnalisation de la surface du biocapteur par un aminosilane afin d'augmenter la probabilité que l'anticorps adhère par son extrémité C terminale (les sites du paratope/domaine Fab au niveau de NH₂ terminal de l'anticorps restent libres).

Un aminosilane a donc été utilisé pour détecter les formes VBNC de *L. pneumophila*.

L'aminosilane utilisé était le (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) :



Ce silane est de formule chimique C₉H₂₃NO₃Si, de chaîne carbonée à 3 carbones permettant la fixation de l'anticorps **par son extrémité COOH**.

Après l'étape de nettoyage, l'électrode d'ITO est fonctionnalisée avec une solution de 2% d'APTES dans le toluène anhydre, pendant une nuit à 60 °C, ce qui permet la formation des SAMs d'aminosilane sur la surface de l'électrode d'une façon covalente. Cette étape est suivie d'un nettoyage des électrodes dans le toluène (3 x 5 min de sonication) pour enlever l'excès des molécules d'APTES, et d'un chauffage dans le toluène à 120 °C pendant 10 min.

La solution d'anticorps est tout d'abord diluée dans le HBS (20 mM, de pH 7.4), puis, les molécules d'anticorps sont activées par l'EDC (dans le MES de pH 4.7) pour permettre aux extrémités COOH de se fixer d'une façon covalente sur les SAMs d'APTES (incubation 2 h à 4 °C).

Les sites libres des SAMs d'APTES, sont ensuite bloqués par 1% de BSA pendant 30 min à 4 °C, avant de passer à l'étape de détection des bactéries à température ambiante, pour inhiber la formation des liaisons non covalente et l'adsorption des bactéries.

VIII. Application sur des échantillons environnementaux

L'isolement de *L. pneumophila* à partir des échantillons environnementaux est souvent difficile en raison de la présence des bactéries hétérotrophes associées [115]. Afin d'évaluer si

nous pouvions détecter la présence de *L. pneumophila* avec plus d'efficacité, nous avons donc utilisé deux versions de capteur fonctionnalisés par deux silanes différents.

Si les performances des deux capteurs ont été évaluées sur des échantillons artificiellement contaminés, seuls le capteur dans sa version APTES a été évalué contre des échantillons naturels (eaux).

L'étude de la performance du capteur dans sa version APTES a été menée sur un total de 34 échantillons environnementaux d'origines variés (hôpitaux, hôtels, foyers universitaires). Les échantillons environnementaux ont été fournis par l'hôpital CHU FARHAT HACHED à Sousse, Tunisie.

Le protocole de traitement des échantillons est conventionnel (AFNOR NF T90-431 de Septembre 2003). A partir des différentes sources environnementales, les échantillons d'eau étaient collectés dans des bouteilles stériles de 1 L, et éventuellement conservés dans 4 °C jusqu'à utilisation.

Un volume de 100 µL de chaque échantillon est directement déposé sur une boîte, nommée G0, de milieu de culture sélectif GVPN (des antibiotiques : Glycérol, Vancomycine, Polymyxine, Natamycine). Chaque échantillon (de 1 L) est ensuite filtré (concentré) sur une membrane de polycarbonate de 0.45 µm. Après filtration, la membrane est récupérée dans 5 mL de l'eau de l'échantillon (concentrat). Le récipient de filtrat est soumis à une sonication pendant 10 min pour bien disperser les bactéries fixées sur la membrane de polycarbonate dans l'eau. 100 µL de concentrat sont déposés sur une boîte de milieu de culture, nommée GI.

Un volume de 1 mL de concentrat est récupéré dans deux tubes séparés. Le concentrat de premier tube subit un traitement thermique de 30 min à 70 °C, et le 2^{ème} concentrat subit un traitement acide (1 mL de HCl 0.2 M stérile - pH 2 pendant 5 min). Les traitements ont été utilisés pour éliminer les organismes contaminants.

Après le traitement, 100 µL du premier tube sont déposés sur une boîte de culture nommée GIT (« T » pour température), et 100 µL du deuxième tube sont déposés sur une autre boîte dite GIA (« A » pour acide).

Finalement, toutes les boîtes sont incubées dans une étuve à CO₂ à 37 °C, pendant 6 à 10 jours. Les colonies ont été comptées au moins trois fois (d'abord à partir de 3 ou 4 jours) jusqu'à la fin de l'incubation. Les colonies de *Legionella* avec une morphologie typique sont repiquées sur leurs milieux BCYE, BCYE sans cystéine et gélose au sang et incubées pendant 48h à 37°C. Les colonies qui poussent sur BCYE seulement sont suspectées d'être des

légionelles. Les colonies correspondant à ce phenotype de croissance sont ensuite identifiées par un test d'agglutination (avec des particules de latex portant des anticorps spécifiques de sérogroupes de *L. pneumophila* ou d'autres espèces) ou par immunofluorescence (la norme laissant le choix de la méthode d'identification).

Pour la caractérisation électrochimique, 10 μL de chaque concentrat ont été incubés sur notre immunocapteur ITO-APTES-MAb pendant 1 h, qui ensuite été soumis à un lavage intense avec le PBS (pH 7.4). Les résultats électrochimiques sont comparés avec ceux obtenus par la technique conventionnelle de culture.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Introduction

De nombreux travaux de recherche visent aujourd'hui le développement des biocapteurs permettant la détection des bactéries en temps réel et « *in situ* ».

Nous avons immobilisé un anticorps monoclonal anti-*L. pneumophila* sur deux films SAMs de silanes, afin d'élaborer des immunocapteurs capables de détecter *L. pneumophila* avec la meilleure sensibilité possible.

D'abord, La première partie sera consacrée à la description des différents résultats expérimentaux relatifs à l'élaboration du biocapteur à base d'époxyxilane. Ensuite, dans la deuxième partie, nous présenterons les résultats de différentes étapes de développement d'un immunocapteur à base d'aminosilane. Suivra enfin une partie dédiée à l'étude de faisabilité de ce dernier immunocapteur sur des échantillons réels.

I. Etude du biocapteur à base d'époxyxilane

Avant de procéder aux différentes étapes de l'élaboration de l'immunocapteur, nous avons opté pour la préparation et le nettoyage des électrodes, comme décrit précédemment dans le chapitre « Matériels et Méthodes » suivant un protocole à base de KOH et de RCA (pour homogénéiser la topographie de la surface et générer des groupements hydroxyles (OH) superficiels, permettant la fixation covalente du GPTMS). L'effet du traitement au KOH de la surface d'ITO au KOH a été démontré au laboratoire dans des travaux précédents [317].

I.1. Caractérisation physico-chimique des surfaces modifiées par l'époxyxilane (GPTMS)

I.1.1. Mesure de l'angle de contact

Dans cette partie, nous nous intéressons à l'étude de la mouillabilité des surfaces, par la méthode de la goutte posée (avec de l'eau), en mesurant l'angle de contact. Cependant, d'après le tableau 3, la surface d'ITO nue présente un faible angle de contact de moins de 5° prouvant la présence de groupements hydroxyles super-hydrophiles obtenus après nettoyage. Ensuite, cette valeur de l'angle de contact augmente jusqu'à 57.6° suite à la modification de la surface par le GPTMS. Cette augmentation pourrait être due à la présence des chaînes alkyles hydrophobes des molécules de GPTMS qui réduisent les groupements hydroxyles de la surface d'ITO nue après l'étape de la silanisation. Ces résultats sont conformes à ceux

obtenus par Luzinov et al. qui ont montré un angle de 51° dans les mêmes conditions mais avec une concentration de 1% en époxysilane [318].

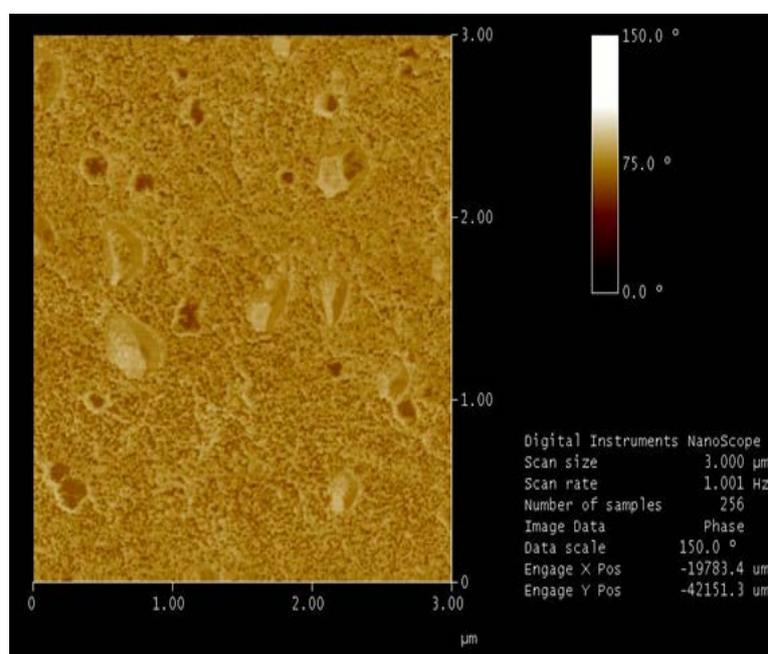
Tableau 3 : Angles de contact des surfaces d'ITO étudiées avant et après modification par le GPTMS.

| Surfaces | Angle de contact |
|-----------|------------------|
| ITO nu | < 5° |
| ITO-GPTMS | 57.6° |

I.1.2. Imagerie AFM

Afin de caractériser la modification des surfaces étudiées, et d'obtenir des informations sur leur architecture, des mesures de microscope à force atomique ont été effectuées. De ce fait, dans cette partie, on a fait le choix de présenter les résultats d'AFM relatifs au substrat de départ (ITO nu avant et après nettoyage) et après les deux suivantes étapes de modification (la fonctionnalisation avec l'époxysilane puis l'immobilisation des MAb).

A



B

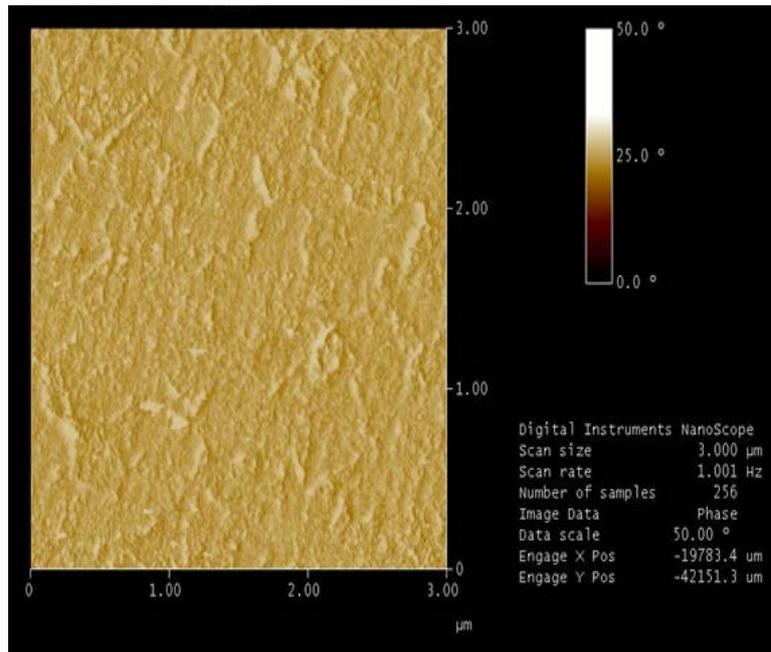
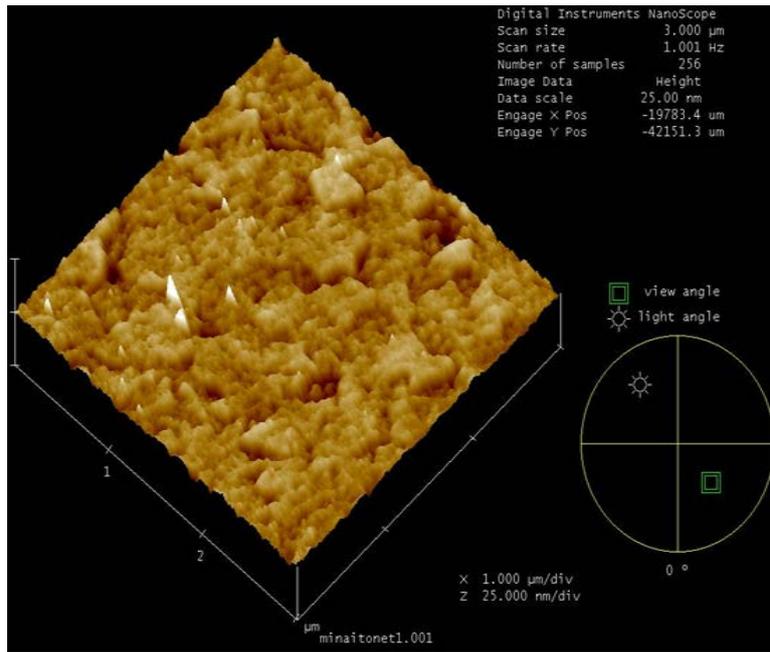


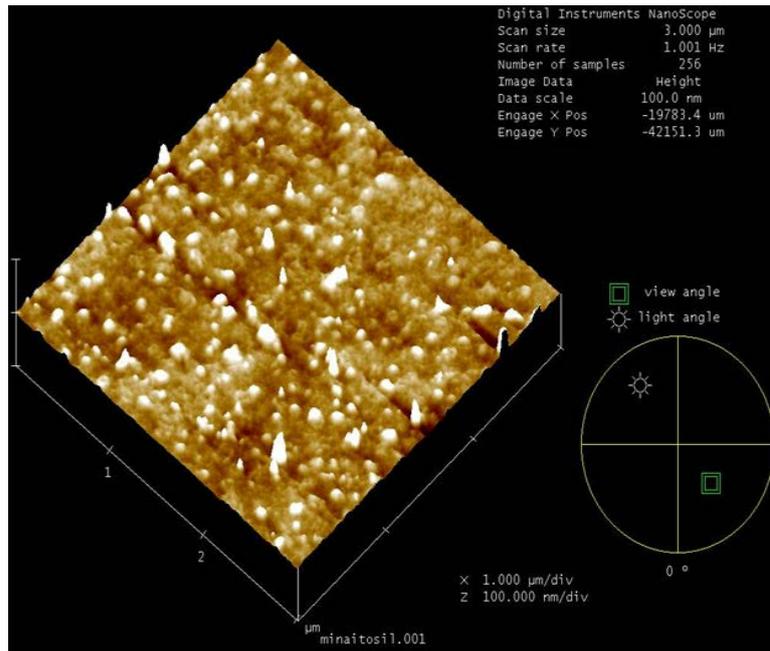
Figure 28 : Images AFM de surface d'ITO nue avant (A) et après (B) nettoyage

Sur la figure 28, il ressort que le nettoyage de surface d'ITO a diminué de façon considérable la rugosité surfacique de l'électrode. Celle-ci passant d'une valeur de RMS de 17 nm à 1.3 nm après l'étape de nettoyage. Cette diminution a été attribuée à l'efficacité du procédé de nettoyage (Figure 28.A). Cette structure est compatible avec le nanographe STM d'une électrode nue, rapporté par Ng et al. [319].

A



B



C

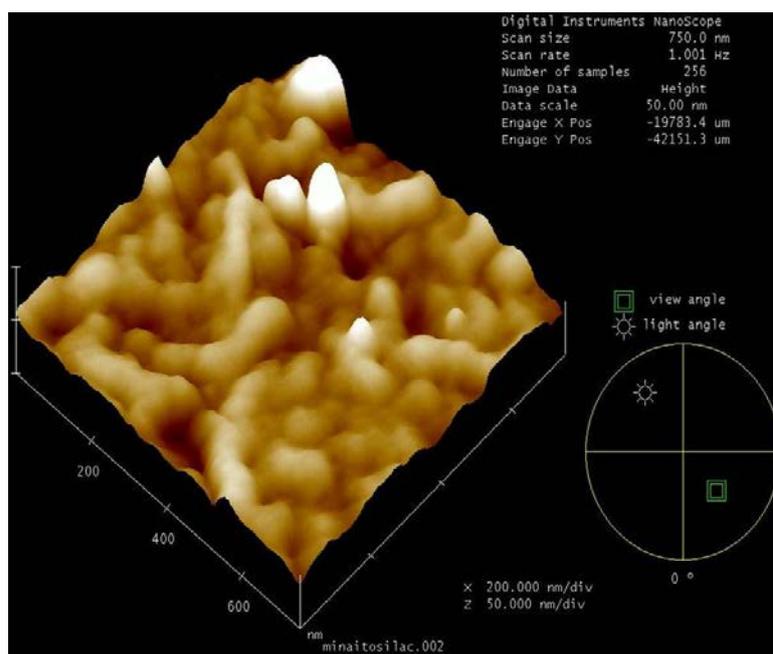


Figure 29 : Images AFM des différentes surfaces : ITO nu après nettoyage (A), ITO-GPTMS (B), ITO-GPTMS-MAb (C)

L'image AFM portée sur la figure 29.B, montre une différence significative de la topographie de surface obtenue après la fixation des monocouches d'époxy silane. Ce résultat montre une légère augmentation de la rugosité de surface, après la formation des SAMs, qui étaient denses, relativement lisses, plus ou moins homogènes avec la présence de quelques agrégats (RMS = 3.13 nm). Cette faible augmentation de valeur de RMS pourrait être attribuée à la faible longueur de la chaîne alkyle de GPTMS. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par Luzinov et al. qui ont fixé des monocouches auto-assemblées à terminaison époxy sur silicium monocristalline et des surfaces d'ITO [318]. La dernière étape de la modification de surface consistant à l'immobilisation des molécules d'anticorps sur la surface fonctionnalisée par l'époxy silane, a montré aussi une augmentation de la rugosité de surface. L'image AFM de la figure 30.C affiche la présence de petites particules globulaires qui pourraient correspondre aux molécules de MAb fixées sur la couche d'époxy silane (Figure 29.C). Ces petites particules d'anticorps conduisent à une augmentation de la rugosité (RMS = 6.7 nm). Ces résultats suggèrent que les molécules d'anticorps n'ont pas été fixées en monocouche, puisque des agrégats d'anticorps peuvent être observés sur la surface de l'électrode.

I.1.3. Spectroscopie d'impédance électrochimique

Les valeurs de spectroscopie d'impédance électrochimique ont été interprétées en utilisant un circuit équivalent de Randles, tels que R_S , C_{DL} , Z_W et R_{TC} représentent, respectivement, la résistance ohmique de l'électrolyte, la capacité de la double couche, l'impédance de Warburg, et la résistance de transfert de charge [210 ; 320] de la sonde redox ferro-ferricyanure $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Toutes les valeurs obtenues de la R_{TC} sont données après avoir tenu compte de la surface d'électrode ($0,07 \text{ cm}^2$). Les valeurs obtenues par le voltalab sont divisées par $0,07 \text{ cm}^2$, avant de les présenter en diagrammes de Nyquist.

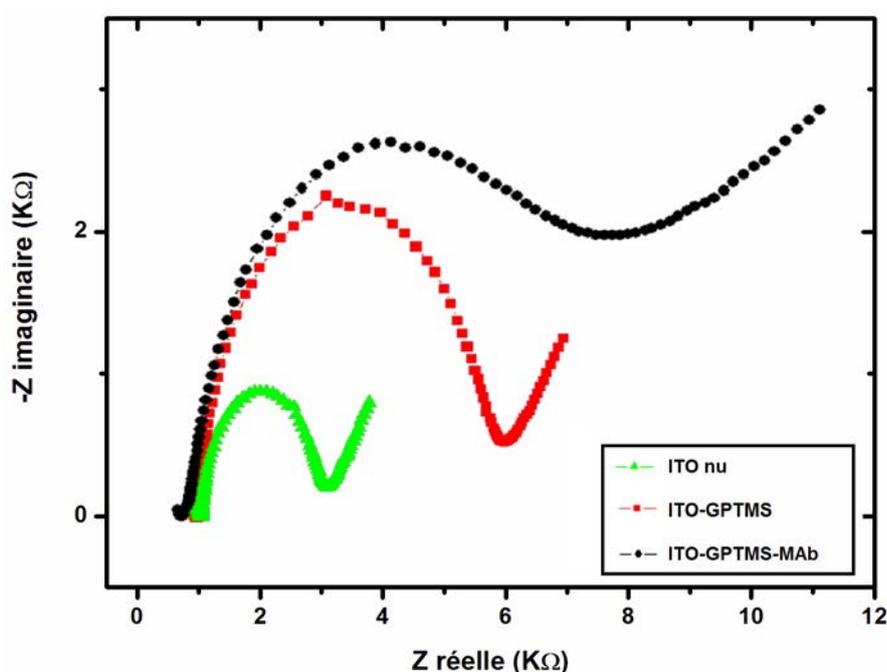


Figure 30 : Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance électrochimique pour l'électrode d'ITO nue (courbe verte), ITO-GPTMS (courbe rouge) et ITO-GPTMS-MAb (courbe noire) en présence du couple redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$

Lors de la caractérisation électrochimique de la surface, la résistance de transfert de charge (R_{TC}) s'opère et aboutit aux changements observés au niveau de la surface de l'électrode après chaque étape de modification. Les résultats obtenus par la méthode de spectroscopie d'impédance électrochimique, portés ici sur la figure 30, sur les surfaces modifiées avec le GPTMS ont montré une augmentation très significative de la résistance de transfert de charge (R_{TC}) (par rapport à l'électrode d'ITO nue). Ce processus correspond à l'inhibition de l'approche directe des espèces redox à la surface de l'électrode. Ce

comportement est attribué à la création d'une barrière bloquante au niveau des surfaces des électrodes après leur fonctionnalisation. Cette barrière d'époxyasilane résultante est compacte, très ordonnée et possède de bonnes propriétés de blocage avec moins de trous [321]. Dans la littérature, le siloxane d'alkyle a été fixé sur des surfaces d'ITO, conduisant ainsi à une forte augmentation de la R_{TC} [322]. De même, après l'immobilisation des anticorps sur la surface de l'électrode et blocage des sites actifs de GPTMS par le BSA, nous remarquons une augmentation de diamètre de demi-cercle de Nyquist, indiquant une augmentation de la résistance de transfert d'électrons entre l'électrode modifiée avec le GPTMS et celle modifiée avec les anticorps. Les expériences montrent qu'il n'y a pas une différence significative entre le Nyquist de surface modifiée avec MAb avant ou après ajout du BSA. Ce processus peut être expliqué par la formation d'une nouvelle barrière supplémentaire, et en outre empêche l'accès de la sonde redox à la surface de l'électrode. Cette augmentation de la valeur de la R_{TC} après chaque étape de modification de surface, prouve que la couche d'anticorps bloque le transfert d'électrons de façon plus efficace que les monocouches d'époxyasilane.

I.1.4. Voltamétrie cyclique

La voltamétrie cyclique est une technique appropriée pour contrôler les différentes étapes de la construction du biocapteur sur l'électrode d'ITO, en utilisant le couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ [323].

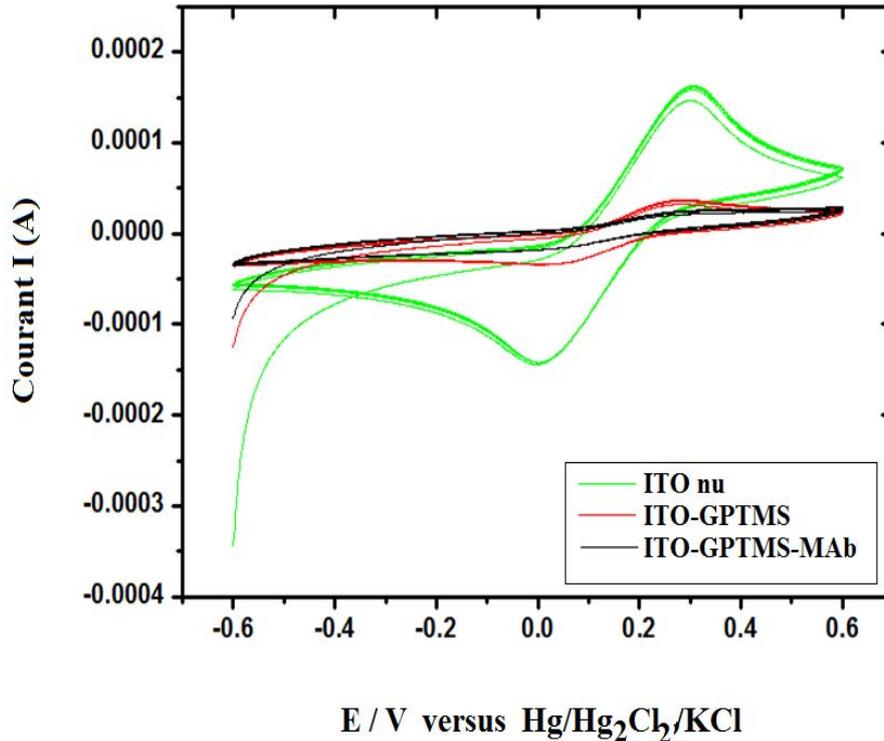


Figure 31 : Voltammogrammes cycliques de l'électrode d'ITO nue (courbe verte), ITO-GPTMS (courbe rouge) et ITO-GPTMS-MAb (courbe noire), en solution PBS (0.16 M, pH = 7.2)

La figure 31 montre les voltammogrammes cycliques enregistrés pour l'électrode d'ITO nue (courbe verte), silanisée (courbe rouge) et modifiée avec les anticorps (courbe noire), en solution PBS (0.16 M, pH = 7.2) contenant 5 mM de sonde redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, avec une vitesse de balayage de 100 mV/s.

En comparant les voltammogrammes obtenus pour les différentes étapes de modification de surface, on note des diminutions significatives des pics de courant allant de l'ITO nu vers l'ITO-GPTMS, puis vers l'ITO-GPTMS-MAb. Ces résultats suggèrent que les monocouches auto-assemblées d'époxy silane ainsi que les molécules d'anticorps agissent comme des barrières pour le transfert d'électrons entre la surface de l'électrode et les espèces redox dans la solution. Ces résultats étant bien évidemment conformes à ceux obtenus par la spectroscopie d'impédance électrochimique.

I.2. Evaluation de la détection de *L. pneumophila*

L'élaboration de notre immunocapteur a suivi trois étapes cruciales :

- Le nettoyage : à base de KOH et le RCA, afin de planifier la surface et créer des groupements hydroxyles superficiels

- La fonctionnalisation : Les électrodes d'ITO nettoyées sont ensuite fonctionnalisées avec des SAMs d'époxyxilane dans le CCl_4 , afin de favoriser la fixation des anticorps monoclonaux.
- Immobilisation des anticorps : Finalement les anticorps monoclonaux spécifiques anti-*L. pneumophila* sont immobilisés sur les surfaces des électrodes fonctionnalisées par liaison covalente.

A la fin de ces différentes étapes, notre substrat est prêt pour la détection des bactéries *L. pneumophila* (Figure 32).

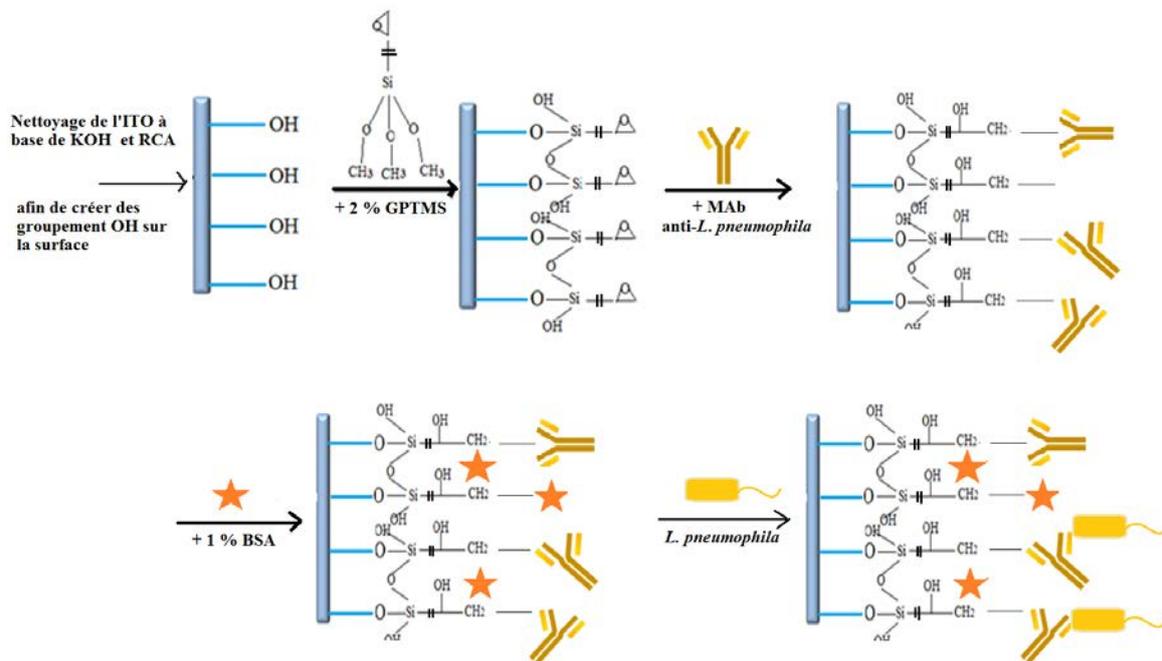


Figure 32: Schéma des étapes de l'élaboration de l'immunocapteur ITO-GPTMS-MAb-Lp1

I.2.1. Microscopie confocale à balayage (CLSM)

Nous avons utilisé la méthode de microscopie confocale (CLSM) pour vérifier l'immobilisation des bactéries sur la surface de l'électrode ITO-GPTMS-MAb. En effet, une suspension de *L. pneumophila* (5.10^6 UFC/mL) a été incubée sur l'électrode pendant une heure à température ambiante afin d'évaluer leur capacité à se lier aux anticorps qui leur sont spécifiques. La surface du biocapteur a ensuite été soumise à un rinçage intense à l'aide du PBS, pour enlever les bactéries adsorbées d'une façon non spécifique. Ensuite une image de CLSM de *L. pneumophila* capturées avec succès sur la surface du biocapteur est représentée ci-dessous (Figure 33) :

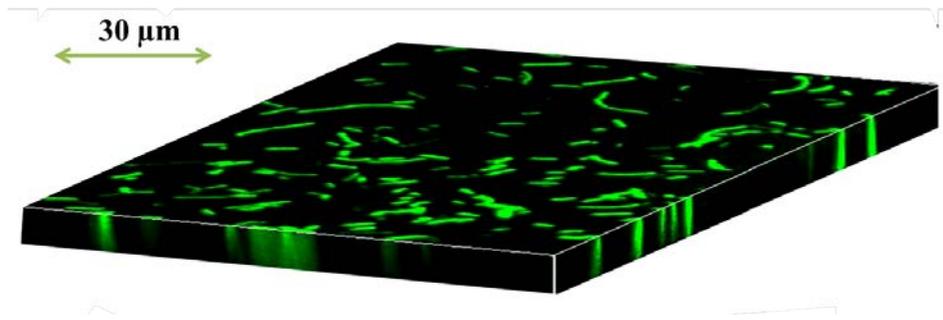


Figure 33 : Image CLSM en 3D de l'électrode ITO-GPTMS-MAb après immobilisation de 5.10^6 UFC/mL de *Legionella pneumophila* non traitée

L'image CLSM de l'immunocapteur après immobilisation des bactéries, présente différentes morphologies de *Legionella* sur la surface. En effet, la dimension des bacilles de *Legionella* peut être influencé par les conditions du milieu (dans l'environnement les bacilles sont de petite taille) ou par la durée de la culture sur leur milieu spécifique (les *Legionella* peuvent avoir une morphologie filamenteuse de dimension plus ou moins importante).

I.2.2. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)

La détection de *L. pneumophila* dans les échantillons d'eaux, a été aussi suivie par la technique de spectroscopie d'impédance électrochimique (Figure 34).

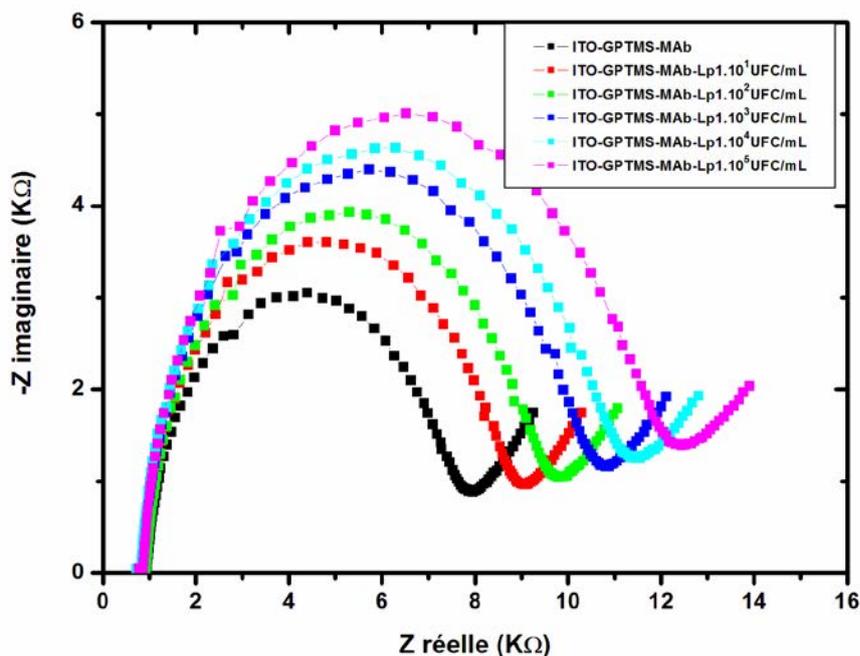


Figure 34 : Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance électrochimique après l'immobilisation des anticorps (ITO-GPTMS-MAb) et la détection des bactéries (10^1 UFC/mL, 10^2 UFC/mL, 10^3 UFC/mL, 10^4 UFC/mL et 10^5 UFC/mL)

Les spectres d'impédance enregistrés portés sur la figure 34, permettent une comparaison des différents constituants élémentaires présents sur les surfaces d'ITO fonctionnalisées, à savoir la surface modifiée par les anticorps (courbe noire) et qui sera après utilisée pour la détection de *L. pneumophila* à différentes concentrations (de $5 \cdot 10^1$ UFC/mL jusqu'à $5 \cdot 10^5$ UFC/mL). La concentration de bactéries déposées sur la surface a été déjà contrôlée, en cultivant 10^2 UFC/mL de *L. pneumophila* sur son milieu spécifique. Le dénombrement des colonies est ainsi possible après une incubation à 37°C pendant 72h. Après les mesures impédimétriques de chaque concentration de *L. pneumophila* immobilisée sur l'électrode, nous avons modélisé le phénomène à l'aide du circuit équivalent de Randles pour déterminer les valeurs de la R_{TC} pour chaque concentration. Le diamètre de diagramme de Nyquist, et donc la résistance de transfert de charge de la sonde redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, augmente progressivement avec l'augmentation des concentrations de *L. pneumophila* dans les échantillons (Figure 34). Ces résultats nous permettent de suggérer la création d'une couche des bactéries qui se fixent sur leur anticorps monoclonal spécifique. Cette couche inhibe l'accès à la surface conductrice aux espèces de la sonde redox. Ainsi la résistance de transfert

de charge entre la sonde en solution et l'électrode augmente. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Ehret et al. [324].

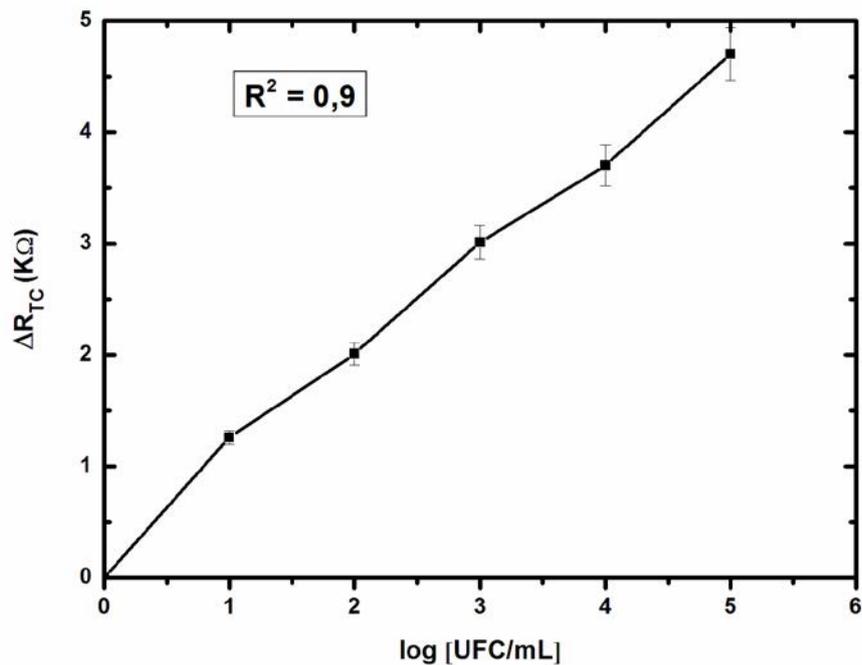


Figure 35: Variation de la résistance de transfert de charge en fonction des concentrations logarithmiques de *L. pneumophila*

La figure 35 montre une relation linéaire entre la variation de la résistance de transfert de charge ($\Delta R_{TC} = R_{TC}(\text{bactérie}) - R_{TC}(\text{anticorps})$) et les différentes valeurs logarithmiques des concentrations de *L. pneumophila* dans l'intervalle compris entre $5 \cdot 10^1$ et $5 \cdot 10^5$ UFC/mL avec un coefficient de corrélation de $R^2 = 0.9$. Les valeurs de la résistance de transfert de charge R_{TC} sont déterminées à partir de la modélisation du dispositif par un circuit équivalent appelé circuit de Randles [298].

La figure révèle aussi qu'un seuil de détection de l'ordre de 10^1 UFC/mL. Ce seuil révèle une bonne sensibilité de notre immunocapteur à base d'époxy silane, due à la spécificité élevée de l'anticorps monoclonal DP-Lp1-O2 utilisé pour les bactéries ciblées répandues dans les échantillons environnementaux complexes pluri-contaminés, comme ont indiqué précédemment Allegra et al. [112]. Ce seuil de détection est considéré comme une valeur basse comparée aux valeurs seuils obtenues par d'autres immunocapteurs qui utilisent la méthode de la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) pour leur détection [325 ; 326], la surface de la résonance de plasmon (SPR) ou par la spectroscopie de mode de lumière de guide d'onde optique (OWLS) [92 ; 327]. En revanche, Li et al. ont montré un seuil de

détection très proche de notre travail (2.10^2 CFU mL⁻¹), en utilisant un immuno-puce à base d'anticorps de *Legionella pneumophila* conjugué à un fluorophore sur une surface d'or [328].

II. Etude du biocapteur à base d'aminosilane

L'immobilisation des anticorps spécifiques sur la surface de l'électrode modifiée constitue une étape clé pour la réalisation d'un biocapteur performant, fiable et robuste. Par conséquent, son affinité, son orientation et sa stabilité jouent un rôle très important dans la détection des bactéries. L'utilisation d'un aminosilane, peut assurer une meilleure orientation de la molécule d'anticorps en la fixant par son Fragment Crystallisable (Fc).

Dans ce travail, nous avons testé si l'utilisation d'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) présentait une plus value en terme de capacité de détection (amélioration de la sensibilité) puisqu'un tel silane permet d'assurer une meilleure orientation des molécules d'anticorps.

Nous avons également souhaité évaluer si un tel biocapteur avait la capacité de détecter des formes physiologiques très mal détectées. En effet, dans des conditions environnementales stressantes, telles que la température [41] ou concentrations osmotiques élevées [329], *L. pneumophila* est connue pour s'adapter et survivre dans un état viable mais non cultivable (VBNC), une stratégie commune à d'autres bactéries [330]. La présence de ces formes VBNC dans les échantillons environnementaux a déjà été démontrée [118 ; 330]. Cependant, la méthode normalisée destinée à la détection de *L. pneumophila* par culture (norme AFNOR NF T90-431) est limitée par son incapacité à détecter les formes VBNC. Nous avons donc voulu vérifier si de telles formes VBNC pouvaient être reconnues par l'anticorps monoclonal utilisé alors que l'épitope cible, exprimé sur la paroi bactérienne, était susceptible soit : 1/ de ne plus être exprimé dans les conditions ayant conduit les bactéries à passer à l'état VBNC ; et ou 2/ d'être éventuellement soumis à des processus de changement de conformation pour les mêmes raisons.

II.1. Caractérisation physico-chimique de surface modifiée par l'aminosilane (APTES)

II.1.1. Mesure de l'angle de contact

Dans cette étude, l'angle de contact observé de la goutte d'eau avec la surface de l'ITO, était de 24°, même si une valeur d'environ 40° a été précédemment rapportée par Mishra et al. [331] pour le même matériau. Cette différence pourrait être expliquée par l'efficacité du procédé de nettoyage à base de KOH pour planifier la surface. Ce résultat montre une valeur

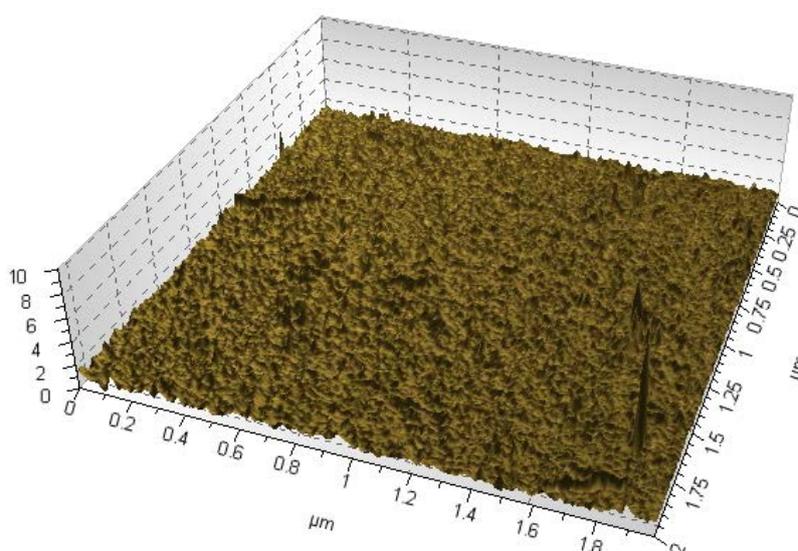
différente à celle obtenue dans notre premier travail ($< 5^\circ$). Cependant, cette différence peut être attribuée à la qualité de l'ITO utilisé. Néanmoins, après la modification de la surface par l'aminosilane, cet angle de contact de l'ITO augmente jusqu'à 55° . Ceci se traduit par la présence des chaînes alkyles hydrophobes de l'APTES. En effet, cette valeur est proche de celle rapportée par notre premier travail de biocapteur fonctionnalisé avec 2% de GPTMS (57.6°) ainsi que par Qin et al. (2007) (59°) [332] dans les mêmes conditions, mais avec une concentration de 5% d'APTES.

Tableau 4 : Angles de contact des surfaces d'ITO étudiées avant et après modification de surface par l'APTES

| Surfaces | Angle de contact |
|------------|------------------|
| ITO nu | 24.14° |
| ITO- APTES | 55.33° |

II.1.2. Imagerie AFM

A



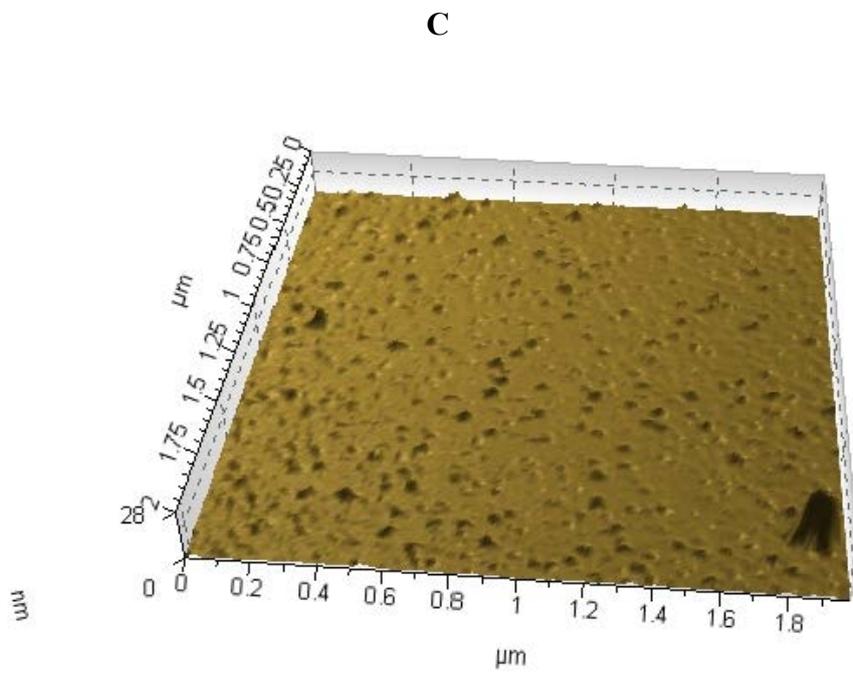
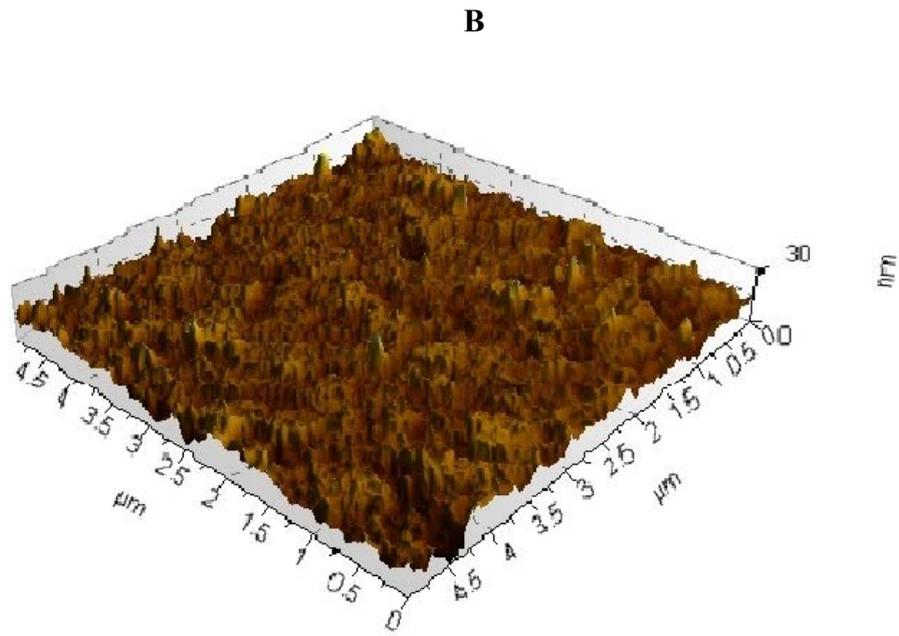


Figure 36: Images AFM pour l'électrode d'ITO nue après nettoyage (A), ITO-APTES (B) et ITO-APTES-MAb (C),

Tableau 5 : Paramètres de la rugosité de la surface d'ITO nue après nettoyage, ITO–APTES et ITO–APTES–MAB

| Paramètres (en nm) | ITO nu | ITO-APTES | ITO-APTES-MAB |
|---------------------------|---------------|------------------|----------------------|
| RMS (ou Sq) | 1.73 | 2.93 | 0.741 |
| Sp | 8.8 | 37.7 | 26.1 |
| Sv | 1.23 | 13.4 | 1.64 |

La microscopie à force atomique (AFM) a été initialement utilisée pour observer la topographie des surfaces et d'étudier leur architecture. Des images en mode « tapping » ont été acquises après chaque étape du processus de modification de surface. Une fois le profil de surface de substrat est mesuré, il est représenté par une courbe d'hauteur Z en fonction de la position X. les hauteurs sont référenciés en convention par rapport à la ligne moyenne qui est calculée comme la moyenne de toutes les hauteurs du profil. On met cette moyenne à 0. Une portion du profil située sur la ligne moyenne, et entre deux passages à 0 est appelée une saillie du profil. Une portion du profil située en dessous de la ligne moyenne, et entre deux passages à 0, est appelée un creux du profil. Sur le profil, on peut repérer l'excurtion maximale en hauteur au dessus du profil. Cette hauteur permet de définir un paramètre Sp appelé hauteur maximale de saillie du profil. De la même manière, on peut déterminer la plus grande profondeur du profil par rapport à la ligne moeynne et définir le paramètre Sv appelé profondeur maximale de creux du profil. La hauteur entre la vallé la plus profonde et le pic le plus haut est une première approche de l'amplitude de la texture de la surface.

L'efficacité de la méthode de nettoyage à base de KOH a été testée (la rugosité surfacique est RMS = 1,73 nm). Ce nettoyage a conduit à l'obtention d'une surface lisse de l'ITO nu, comme déjà montré précédemment [257] dans les mêmes conditions. La topographie de la surface d'ITO montre une différence significative après la modification par les SAMs d'APTES. L'image de l'AFM de l'électrode ITO fonctionnalisée a montré une valeur de RMS = 2,93 nm (figure 36.B), ce qui révèle une structure régulière en forme d'îlots, tel que rapportée par Mishra et al. [331]. Cette augmentation de la rugosité de surface peut être attribuée à la formation des couches multiples de l'aminosilane. En revanche, d'autres études, en utilisant des micrographies de la microscopie électronique à balayage (MEB), ont montré des surfaces de monocouches d'APTES lisses avec d'autres concentrations d'APTES [333].

L'étude de l'affinité, l'orientation et la stabilité des molécules d'anticorps est une étape cruciale dans la fabrication de notre immunocapteur à base d'APTES. La littérature contient de nombreux procédés pour l'immobilisation d'anticorps. L'utilisation de la protéine A en tant que protéine de liaison est un moyen reconnu pour orienter les molécules d'IgG à l'égard de la surface du transducteur. Cependant, la protéine A peut fixer, au maximum, deux molécules d'anticorps [334]. Selon Puertas et al. [335], l'utilisation de protéines adaptatrices ayant la capacité d'interagir spécifiquement avec la région constante de l'anticorps (fragment Fc) ajoute une étape supplémentaire. Cela implique une autre biomolécule, qui est à la fois coûteuse et prend du temps.

En 2012, Vashist a comparé trois stratégies différentes pour activer les fonctions carboxyles (COOH) de l'anticorps : EDC, EDC / NHS, et EDC / S-NHS [334]. Puisque l'ester de NHS est plus réactif que l'ester d'EDC, cela pourrait conduire à la formation d'agrégats d'anticorps, qui les empêche de se lier à la surface fonctionnalisée par l'APTES. En conséquence, il a été conclu que l'activation par l'EDC était le moyen le plus efficace pour une meilleure orientation pour la majorité des molécules d'anticorps. Pour cette raison, cette approche a été adoptée dans la présente étude. Les groupes carboxyle des anticorps monoclonaux anti-*L. pneumophila* activés par l'EDC ont été capturés par liaison covalente sur l'électrode silanisée, tel que rapporté par Vashist [334] et les sites non spécifiques ont été bloqués avec la protéine BSA. L'image de l'AFM portée sur la figure 36.C montre une morphologie complètement changée, par rapport à la surface de l'ITO fonctionnalisée, suite à l'immobilisation des anticorps, avec une valeur de RMS de 0,741 nm. Cette faible valeur suggère que les couches peuvent être considérées comme lisses, et l'image de l'AFM indique une surface homogène. La réduction de la rugosité de surface après modification de l'ITO-APTES avec l'anticorps pourrait être attribuée à une diminution de l'inhomogénéité de la surface créée par les multicouches de silane. En effet, les groupements COOH activés interagiraient facilement avec les NH₂ de la surface ITO – APTES. Le taux de couverture de cette surface serait augmenté ; ce qui conduirait à une diminution de la rugosité [336 ; 337]. De la même façon, cette diminution de la rugosité de surface peut probablement être due au blocage des sites non spécifiques par le BSA, qui est une protéine beaucoup plus petite que l'anticorps, et qui peut occuper les espaces vides pour permettre l'obtention d'une surface moins rugueuse.

II.1.3. Microscopie confocale à balayage (CLSM) :

La répartition des anticorps anti-*L. pneumophila* sur la surface de l'électrode ITO-APTES a aussi été étudiée par le microscope confocal à balayage laser (CLSM) en utilisant un anticorps fluorescent anti-anticorps anti-*L. pneumophila*. Après la préparation de l'électrode (voir chapitre précédent), une concentration plus élevée de l'anticorps fluorescent anti-MAb (50 μ L de la concentration 1 mg/mL d'anti-anticorps) a été incubée sur l'électrode ITO-APTES-MAB à 4°C pendant 2 h. L'électrode a ensuite été soumise à un rinçage intense avec le HBS, pour enlever les molécules adsorbées sur la surface d'une manière non spécifique, puis séchée.

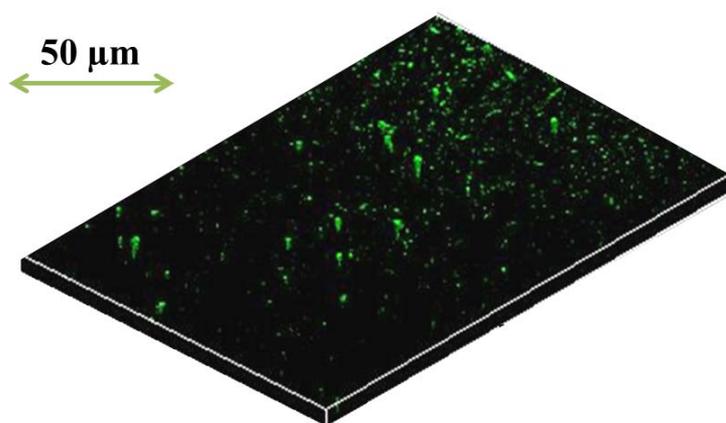


Figure 37 : Image CLSM en 3D de l'immobilisation de l'anticorps anti-*L. pneumophila*

Sur l'image CLSM de la surface de l'électrode présentée dans figure 37, on remarque que les anticorps anti-anticorps fixés, en termes de fluorescence, permettent de suivre l'emplacement des molécules d'anticorps anti-*L. pneumophila*. En effet, on constate que ces molécules sont réparties sur la surface fonctionnalisée sous forme d'agrégats.

II.1.4. Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) :

Afin de suivre les différentes étapes de modification des surfaces d'ITO, nous avons utilisé la méthode de la spectroscopie d'impédance électrochimique. Des mesures électrochimiques ont été réalisées pour caractériser les surfaces d'ITO nue, ITO modifié avec l'APTES, et l'ITO fonctionnalisé après immobilisation des anticorps.

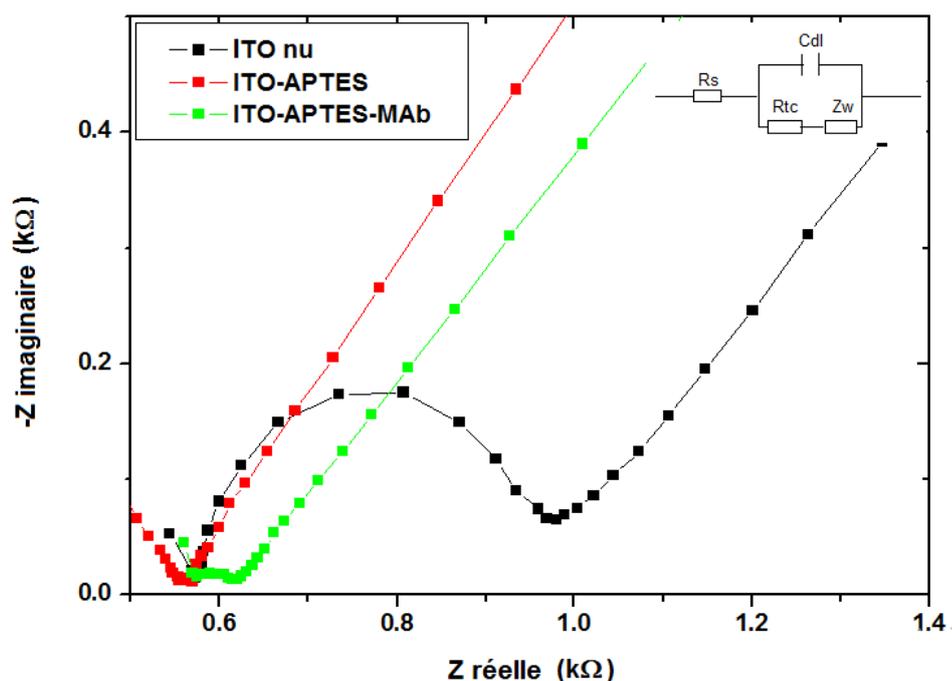


Figure 38 : Spectres de Nyquist obtenus pour ITO nu (courbe noire), ITO-APTES (courbe rouge) et ITO-APTES-MAb (courbe verte). Le schéma inséré montre le circuit équivalent de Randles

Les résultats de spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) ont été interprétés suite à l'utilisation de circuit équivalent de Randles, de la même manière que précédemment.

La figure 38 montre les courbes des spectres d'impédance de Nyquist de l'ITO nu, l'électrode modifiée par l'aminosilane, et l'électrode immobilisant les anticorps anti-*L. pneumophila*. L'électrode d'ITO nue montre une valeur de R_{TC} de 449,4 Ω . Henke et Krull [338] ont montré que le silane a rendu possible la liaison covalente à une surface recouverte d'un silanol. En comparant les spectres portés sur la figure 38 nous remarquons que la valeur de la R_{TC} a été considérablement réduite (2,62 Ω) après la fonctionnalisation de l'ITO avec l'APTES. Telle que rapportée par Ahuja et al. [333] et Zor et al. [320], cette très faible valeur de résistance de transfert de charge suggère que les SAMs de l'APTES facilitent le transfert d'électrons à la surface de l'électrode. En revanche, l'immobilisation de l'anticorps sur l'électrode modifiée par l'APTES a entraîné une faible augmentation de la valeur de la R_{TC} à 35,11 Ω . Cette augmentation de la résistance de transfert de charge suggère une couverture importante des électrodes modifiées avec l'APTES par la couche d'anticorps, ce qui a créé une petite barrière empêchant le transfert des électrons vers la surface de l'électrode ITO-APTES.

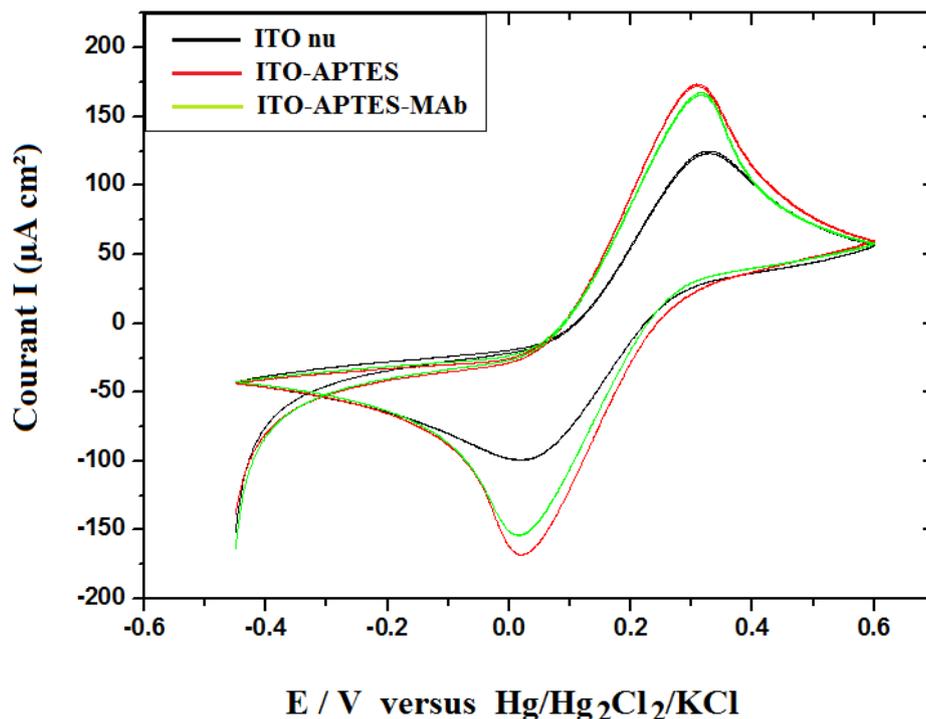


Figure 39: Voltammogrammes cycliques de l'électrode d'ITO nue (courbe noire), ITO-APTES (courbe rouge) et ITO-APTES-MAb (courbe verte), en solution PBS (0.16 M, pH = 7.2)

Chaque étape impliquée dans la construction du biocapteur a également été caractérisée par la technique de voltamétrie cyclique en utilisant 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ comme couple redox avec une vitesse de balayage de 100 mV/s (figure 39). Dans chaque expérience de voltamétrie cyclique, le 5^{ème} cycle a été considéré comme stable car aucun changement majeur n'a été observé dans les cycles suivants. Comme présenté dans le voltammogramme, le pic du courant augmente de l'ITO nu à l'ITO modifié par l'aminosilane à cause des interactions entre les charges positives des groupements amine (NH_3^+) de la molécule APTES [339, 340, 341] avec les charges négatives du couple redox [337]. Cette interaction facilite le transfert des électrons entre l'électrode de travail et le couple redox [342]. En revanche, après la fixation des anticorps sur la surface de l'électrode ITO-APTES, le voltammogramme montre une légère diminution du pic du courant. Cette réduction peut être attribuée à la formation d'une couche d'anticorps, à la surface de l'électrode, qui a légèrement bloqué le transfert d'électrons entre l'électrode et le couple redox, comme été prouvé dans notre premier travail [257].

Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par les mesures de la variation de l'impédance électrochimique.

II.2. Elaboration de l'immunocapteur et évaluation de la détection des formes VBNC de *L. pneumophila*

Afin d'élaborer notre immunocapteur, les trois étapes de modification de surfaces ont été appliquées, commençant par le nettoyage, puis la fonctionnalisation des électrodes par les SAMs d'aminosilane (APTES) dans le toluène anhydre, avant de passer à la dernière étape de l'immobilisation des anticorps. Les fonctions amines des SAMs d'APTES, favorisent l'orientation des anticorps, et leur fixation par leur Fc. Enfin notre immunocapteur est prêt à être utilisé pour la détection des formes VBNC de *L. pneumophila* (Figure 40).

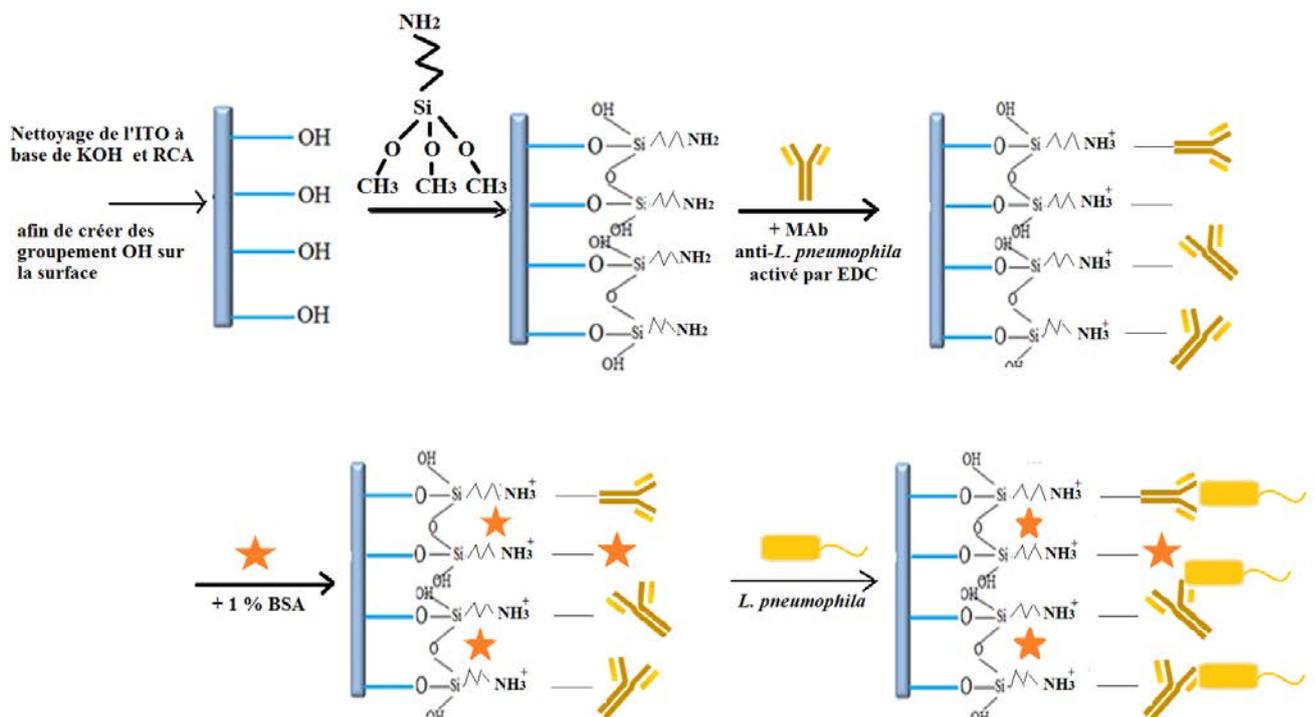


Figure 40 : Schéma des différentes étapes de l'élaboration de l'immunocapteur ITO-APTES-MAb-Lp1 (VBNC)

II.2.1. Co-culture sur amibe *Acanthamoeba polyphaga* :

Cette technique a été illustrée dans le chapitre précédent.

La technique de la culture sur amibes, a été utilisée pour valider que les formes VBNC générées après traitement thermique (lesquelles étaient déposées sur le capteur en

version APTES) étaient susceptibles d'être ressuscitées (après contrôle de leur incapacité à croître sur milieux de culture).

Après la culture des amibes dans des puits enrichis par leur milieu spécifique PYG (72 h à 30 °C), des suspensions de *L. pneumophila* non traitées et traitées (30 min à 70°C) ont été ajoutées dans les puits, en gardant un puits témoin négatif (amibe sans bactéries). Après incubation de la plaque pendant 72h à 37 °C, on a remarqué que le milieu PYG devient un peu trouble, sauf le puits témoin négatif. Des suspensions de chaque puits ont été cultivées sur des milieux GVPC (72 h à 37 °C). Finalement, des colonies de *Legionella* apparaissent sur les boîtes de milieu GVPC. Ces résultats confirment que, après une co-culture sur des amibes *Acanthamoeba polyphaga*, les formes VBNC de *L. pneumophila* retrouvent leur état cultivable. Cela est corrélé avec les résultats obtenus dans plusieurs études, tels qu'Epalle et al. [41], Garcia et al. [157] et Mustapha et al. [119].

II.2.2. La technique de PCR quantitative (q-PCR) :

La PCR est une technique alternative pour une détection rapide de *Legionella pneumophila* dans les échantillons d'eaux environnementaux. Elle a été normalisée en France (AFNOR NF T90-4671). Le taux de détection de l'ADN de *L. pneumophila* par la PCR quantitative est généralement supérieur à 90% dans les échantillons positifs [106 ; 343 ; 344].

Dans notre travail, le protocole de la technique PCR et les conditions d'amplification ont été illustrés dans le chapitre précédent.

La technique de PCR quantitative en temps réel a été utilisée pour contrôler la qualité des concentrations des suspensions de *L. pneumophila* (vérification des concentrations totales en *L. pneumophila*) avant et après le traitement thermique.

Les tubes des échantillons ont été préparés suivant une série de dilution. Cette série de dilution a été préparée avant l'extraction de l'ADN. Des dilutions en cascade ont été préparées avec des suspensions de *L. pneumophila* non traitée (NT) que traitée (T) (30 min, 70 °C) pour avoir des concentrations de 10^6 à 10^1 UFC/mL. Finalement, la technique de la PCR quantitative en temps réel a été faite avec un témoin négatif (eau distillée stérile), deux témoins positifs (suspensions à 10^8 et 10^7 UFC/mL), six extraits d'ADN correspondant aux dilutions des suspensions non traitées de 10^1 à 10^6 UFC/mL et six extraits d'ADN correspondant aux dilutions des suspensions traitées de 10^1 à 10^6 UFC/mL (Figure 41). Les extraits correspondant aux dilutions des deux types de suspension peuvent être assimilés à des échantillons artificiellement contaminés.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Témoins positif 10 ⁸ | Témoins positif 10 ⁷ | 10 ⁶ Bactéries NT | 10 ⁶ Bactéries T | | | | | | | | |
| B | Témoins négatif | | 10 ⁵ Bactéries NT | 10 ⁵ Bactéries T | | | | | | | | |
| C | | | 10 ⁴ Bactéries NT | 10 ⁴ Bactéries T | | | | | | | | |
| D | | | 10 ³ Bactéries NT | 10 ³ Bactéries T | | | | | | | | |
| E | | | 10 ² Bactéries NT | 10 ² Bactéries T | | | | | | | | |
| F | | | 10 ¹ Bactéries NT | 10 ¹ Bactéries T | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Figure 41 : Schéma de la plaque de 96 puits pour la technique de la PCR quantitative en temps réel

Un extrait de résultats de la détection de *L. pneumophila* par la technique de la PCR quantitative en temps réel est présenté dans le tableau 5 suivant.

Tableau 6 : Résultats des échantillons bactériens (avant et après traitement) représentés par le nombre de cycles nécessaires pour l'amplification des molécules d'ADN

| Bactéries non traitées (NT) | Nombre de cycles | Bactéries Traitées (T) | Nombre de cycles |
|-----------------------------|------------------|------------------------|------------------|
| 10 ⁸ | 17.7 | | |
| 10 ⁷ | 21.4 | | |
| 10 ⁶ | 26.8 | 10 ⁶ | 26.6 |
| 10 ⁵ | 28 | 10 ⁵ | 31.7 |
| 10 ⁴ | 32 | 10 ⁴ | 35.3 |
| 10 ³ | 34.7 | 10 ³ | 34.4 |
| 10 ² | 34.4 | 10 ² | 34.4 |
| 10 ¹ | 36.9 | 10 ¹ | 37.16 |
| Témoins (-) | 42.5 | | |

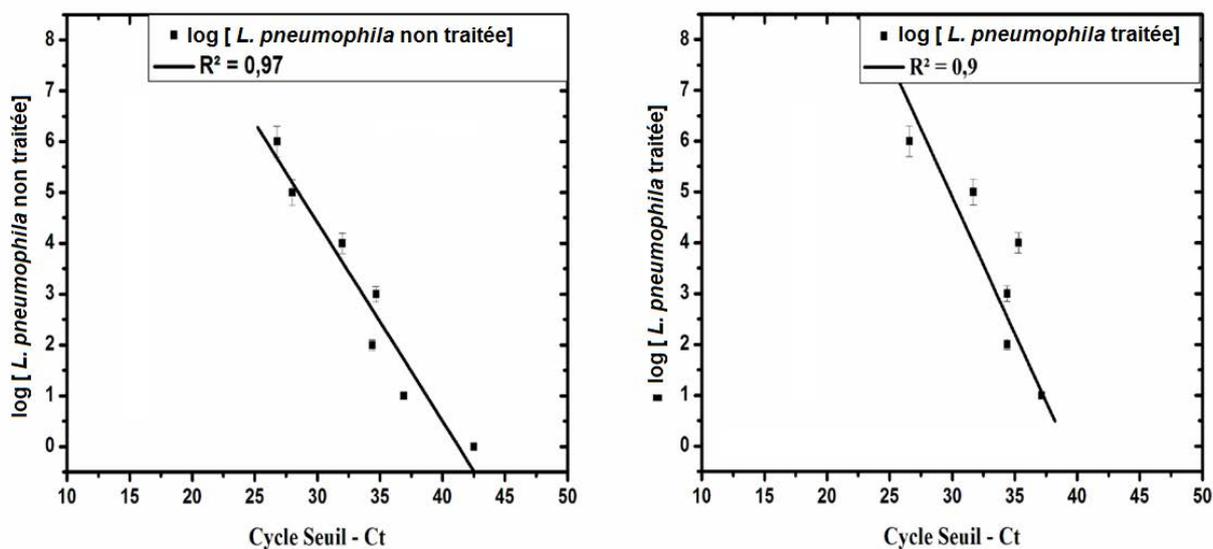


Figure 42 : Courbes de calibration standard pour les valeurs de Ct en fonction des log des concentration des formes non-traitées et traitées de *L. pneumophila*

Les valeurs des Ct obtenues sont représentées en fonction des logarithmes des concentrations bactériennes. Les résultats de notre expérience (Figure 42) montrent des valeurs de Ct quasi-identiques pour l'échantillon avant et après traitement. On obtient alors une droite avec un coefficient de corrélation ($R^2 = 0,9$) identique pour l'échantillon avant et après traitement par choc thermique.

La valeur de Ct obtenue à partir d'un échantillon inconnu, est reportée sur la droite standard de calibration, et permet alors de déduire la valeur du log de la concentration en *L. pneumophila* à l'intérieur des échantillons.

Pour des raisons matérielles, il n'a pas pu être procédé à l'analyse en PCR des échantillons réels testés en culture et vis à vis du capteur dans sa version APTES.

II.2.3. La cytométrie en flux (FCA) :

Pour valider la présence des différentes formes viables ou morte de *L. pneumophila* dans un échantillon mais en particulier pour vérifier que les suspensions bactériennes soumises à un traitement thermique de 30 min à 70°C ne contenaient que des VBNC (contrôle important pour vérifier que le capteur dans sa version APTES était bien capable de détecter des formes VBNC sans interférence avec des formes viables cultivables), nous avons utilisé la technique de la cytométrie en flux, qui révèle des informations sur les pourcentages de différentes formes présentes de *Legionella* telles que des cellules mortes, des cellules viables et cultivables (VC) et des VBNC, avant et après le traitement par choc thermique.

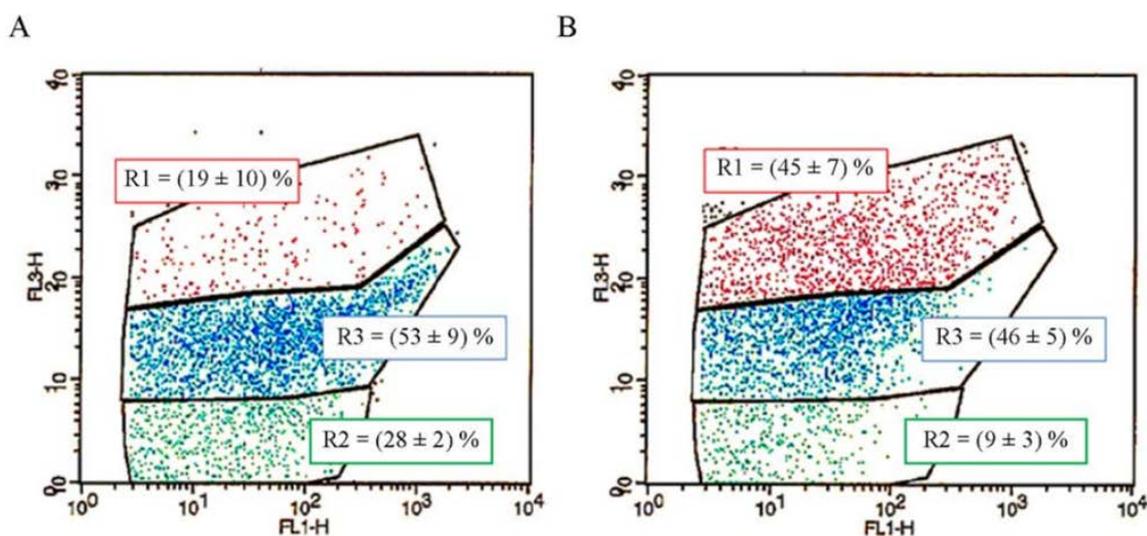


Figure 43 : Evaluation des caractéristiques d'une suspension de 10^6 UFC/mL de *L. pneumophila* par la cytométrie en flux, avant (A) et après (B) le traitement thermique de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min (R1 : Cellules mortes, R2 : Cellules viables et cultivables, R3 : VBNC)

La figure 43 montre un résultat représentatif de 4 expériences indépendantes. Dans les échantillons, le traitement à $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min génère : $(45 \pm 7)\%$ de cellules mortes (R1), $(46 \pm 5)\%$ de VBNC (R3), et $(9 \pm 3)\%$ de cellules viables cultivables (R2) (Figure 43.B) contre $(19 \pm 10)\%$ de cellules mortes (R1), $(53 \pm 9)\%$ de VBNC (R3) et $(28 \pm 2)\%$ de cellules viables cultivables (R2) (Figure 43.A) pour les formes non traitées de *L. pneumophila*.

Ces résultats et en particulier ceux associés au pourcentage des cellules viables cultivables (R2) dans les suspensions traitées thermiquement, compte tenu de la sensibilité de cytométrie en flux, confirment qu'il existe une fraction très minoritaire de cellules toujours viables cultivables lesquelles ont été déposées sur le capteur dans sa version APTES. Cette faible proportion ne saurait statistiquement contrarier l'analyse de la performance du capteur relativement à sa capacité à reconnaître des formes VBNC d'autant que les contrôles en culture sur ces mêmes suspensions n'ont pas permis de constater la croissance de *L. pneumophila*.

Il faut néanmoins bien noter qu'il aurait fallu - en toute rigueur - pouvoir trier la seule population VBNC avant de la déposer sur le capteur dans sa version APTES. Au moment où ces expérimentations ont été conduites, le trieur de cellule nécessaire n'était pas encore installé au laboratoire GIMAP (il l'a été depuis).

Logiquement, d'après les résultats obtenus par la cytométrie en flux, nous aurions dû détecter avec le biocapteur le même nombre de bactéries avant et après traitement, seules les proportions des formes physiologiques ayant changé (si l'on part du principe que les formes mortes sont pour la plupart encore intègres comme tant à le montrer l'analyse par cytométrie en flux qui « reconnaît » des formes cellulaires ayant internalisé l'IP).

La performance de notre immunocapteur à base d'aminosilane APTES a été évaluée d'abord sur des échantillons artificiels (suspensions calibrées de *L. pneumophila*) non traitées (figure 44). Des dilutions en cascade de *Legionella* ont été préparées à partir d'une suspension de concentration 10^8 UFC/mL ($DO_{600nm} = 0.2$). Dans une seconde étape, la même suspension de 10^8 UFC/mL a été traitée par choc thermique de 70 °C pendant 30 min afin de générer des formes VBNC de *L. pneumophila*, avant de passer à la préparation des différentes dilutions. Pour ces échantillons, la présence des formes VBNC a donc été évaluée à l'aide d'un cytomètre en flux.

Un test de contrôle a été effectué par culture sur milieu spécifique GVPN des échantillons après traitement, et aucune colonie n'était observée après 72 h d'incubation à 37 °C. Les réponses des mesures impédimétriques sont présentées par une relation entre la variation relative de la R_{TC} ($(R_{TC}(\text{bactérie}) - R_{TC}(\text{anticorps})) / R_{TC}(\text{anticorps})$) en Ω et la valeur logarithmique de la concentration de *L. pneumophila* dans l'intervalle de 10^1 à 10^5 UFC/mL pour les deux formes non traitées et traitées (Figure 45). Cette variation relative de la résistance de transfert de charge est l'un paramètre pertinent déduits des mesures de l'impédance électrochimique. Sa valeur est étroitement liée à la structure de l'interface électrode – électrolyte. Lors de la détection des bactéries, ces dernières sont immobilisées sur la surface de l'électrode via l'interaction immunologique (Ac – Ag). L'impédance électrique, donc la résistance électrique dépend de la quantité de bactéries captées.

Notre objectif est de chercher une loi mathématique qui régit la résistance R_{TC} et la concentration des bactéries. En fonction de la concentration en bactéries, la R_{TC} semble varier linéairement. Une meilleure modélisation du circuit équivalent donnerait d'une part des valeurs de la R_{TC} plus exactes et conduirait d'autre part à une loi plus rigoureuse.

Pour les échantillons de bactéries non traitées, les réponses ont été mesurées, par la technique de l'impédance électrochimique, avant et après leur fixation sur l'électrode ITO-APTES-MAb. Plusieurs concentrations ont été testées : sans bactéries (contrôle négatif), 10^1 UFC/mL, 10^2 UFC/mL, 10^3 UFC/mL, 10^4 UFC/mL, et 10^5 UFC/mL (Figure 44).

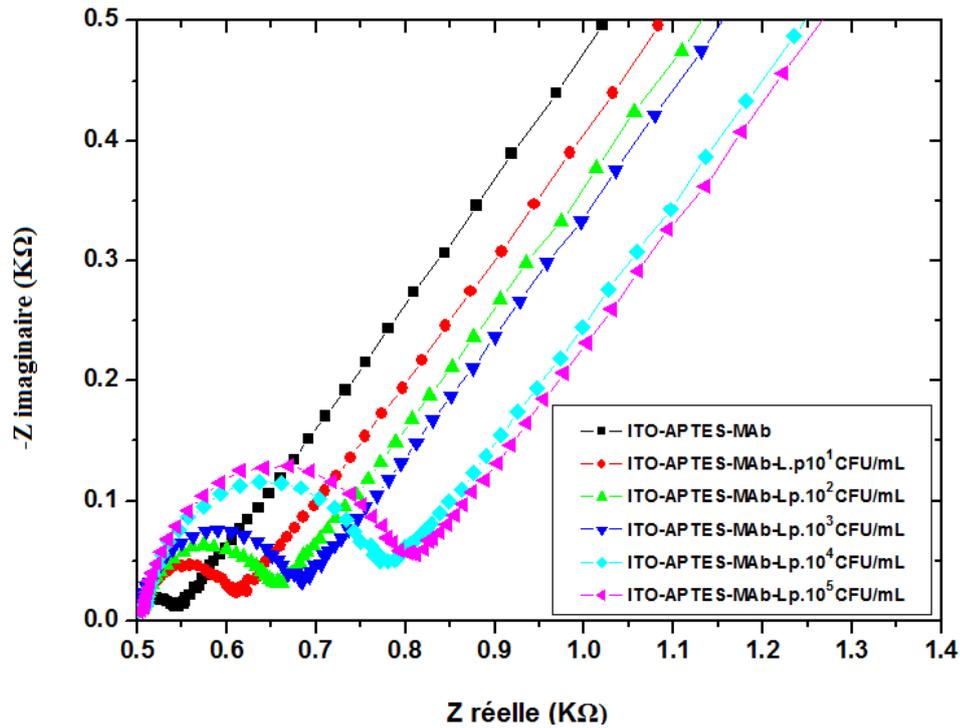


Figure 44 : Diagrammes de Nyquist obtenus pour des concentrations croissantes de formes non traitées de *L. pneumophila* ; (■) sans bactéries, (●) 10^1 UFC/mL, (▲) 10^2 UFC/mL, (▼) 10^3 UFC/mL, (◆) 10^4 UFC/mL et (■) 10^5 UFC/mL

L'augmentation de la valeur des R_{TC} de 97,27 Ω pour 10^1 UFC/mL à 246,90 Ω pour 10^5 UFC/mL suggère : (i) la possibilité de détecter *L. pneumophila* (sans distinction des formes physiologiques) dans cette gamme de concentration dans les échantillons ; et (ii) une performance légèrement supérieure de cet immunocapteur APTES par rapport à son homologue au GPTMS [257], étant donné qu'il utilise dix fois moins de MAb (en concentration) que le capteur de GPTMS pour détecter la plus faible concentration de *L. pneumophila* soit 10^1 UFC/mL.

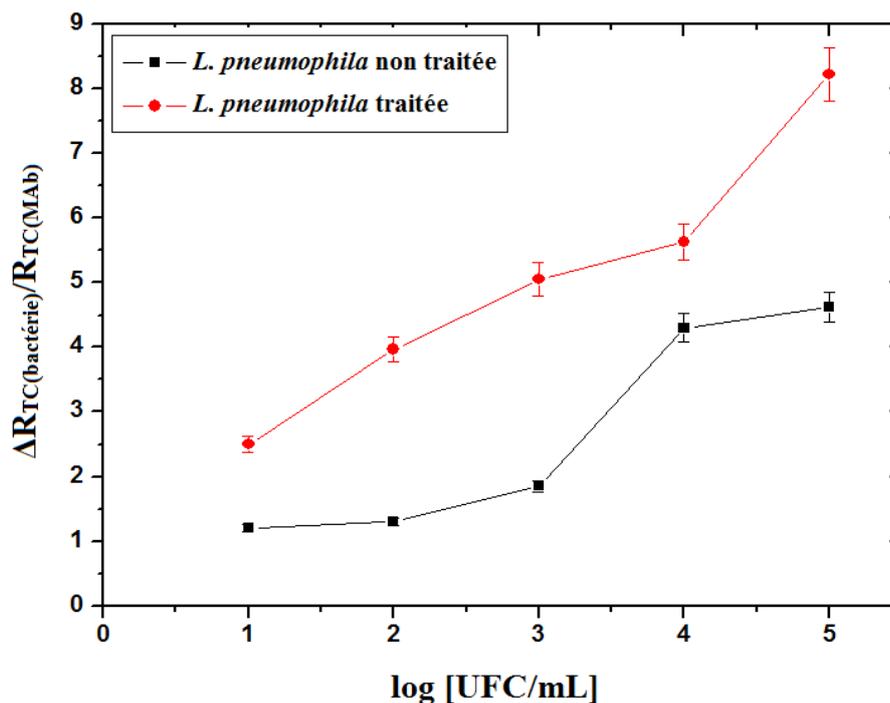


Figure 45 : Variation relative de la R_{TC} en fonction du logarithmique de la concentration de bactéries non traitées (courbe noire) et traitées par la chaleur (courbe rouge) de *L. pneumophila*

Pour les échantillons traités par la chaleur une légère augmentation des valeurs d'impédance a été observée avec des concentrations croissantes de bactéries (Figure 45). En effet, La valeur de la R_{TC} a changé de 121,60 Ω pour 10^1 UFC/mL à 320,00 Ω pour 10^5 UFC/mL de *L. pneumophila* traitée.

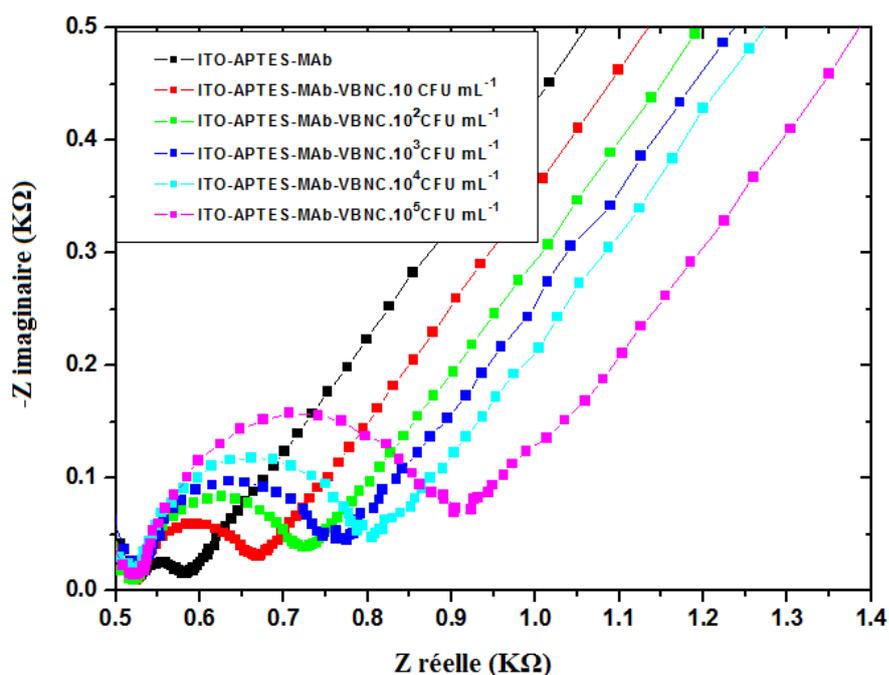


Figure 44 : Diagrammes de Nyquist obtenus pour des concentrations croissantes des formes traitées de *L. pneumophila* ; (■) sans bactéries, (■) 10^1 UFC/mL, (■) 10^2 UFC/mL, (■) 10^3 UFC/mL, (■) 10^4 UFC/mL et (■) 10^5 UFC/mL

Les résultats portés sur la figure 46, montrent que les spectres de Nyquist de l'ITO modifié par MAb ont également été utilisés pour démontrer les modifications de surface (propriétés électriques) pour différentes concentrations de formes traitées de *L. pneumophila* : sans bactéries (contrôle négatif), équivalent de 10^1 UFC/mL, équivalent de 10^2 UFC/mL, équivalent de 10^3 UFC/mL, équivalent de 10^4 UFC/mL et l'équivalent de 10^5 UFC/mL.

Lorsque l'on compare les valeurs de la R_{TC} observées entre les suspensions non traitées et traitées de *L. pneumophila* avec des concentrations identiques (97,27 Ω et 121.60 Ω pour 10^1 UFC/mL respectivement pour les formes non traitées et traitées de *L. pneumophila* sg1), il est tentant de spéculer que les bactéries traitées (VBNC pré-existantes, VBNC nouvellement générées, et potentiellement certaines formes de cellules mortes si leurs membranes sont encore intactes) sont légèrement mieux reconnues par le MAb utilisé que leurs homologues non traitées. Ces résultats corroborent les travaux d'Alleron et al. (2013) qui ont démontré une accumulation de certaines protéines de virulence dans les formes VBNC après avoir utilisé le traitement à la monochloramine. Cela suggère une éventuelle surexpression des épitopes reconnues par notre anticorps ou peut provenir du fait que le nombre de bactéries mortes peut fausser les résultats, si leur membrane est encore intacte (voir résultats de cytométrie en flux).

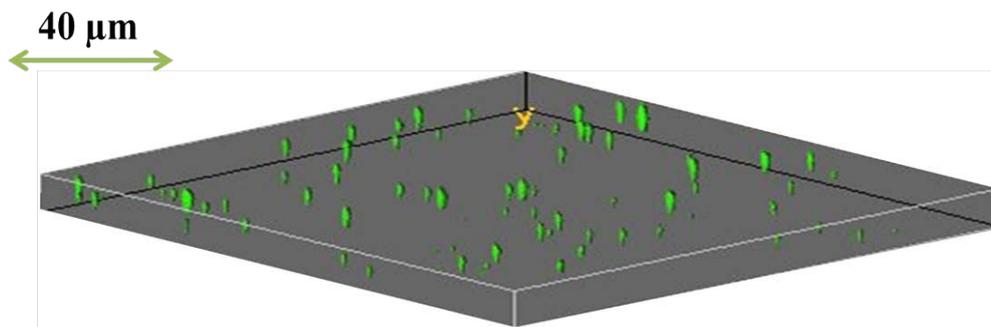


Figure 45 : Image CLSM en 3D pour l'électrode ITO-APTES-MAb après immobilisation des formes traitées de *L. pneumophila* (10^6 UFC/mL)

L'image CLSM confirme que notre immunocapteur ITO-APTES-MAb est capable de détecter les formes traitées thermiquement de *L. pneumophila* (Figure 47). Il a été montré précédemment que les électrodes d'ITO modifiées par le GPTMS pourraient être utilisées pour détecter les formes non traitées de *Legionella pneumophila* dans l'intervalle de 5.10^1 UFC/mL à 5.10^5 UFC/mL [257]. En utilisant cet immunocapteur à base d'APTES, à peu près la même performance a été observée avec des bactéries non traitées bien qu'il utilise dix fois moins de MAb que le capteur précédant à base de GPTMS. En comparaison avec GPTMS, les présents résultats semblent indiquer un léger avantage pour l'immobilisation d'anticorps lorsque la surface du capteur a été modifiée avec l'APTES. Chimiquement, cette immobilisation doit être la même sur les deux molécules de silane, car les groupes NH_2 et COOH du MAb sont répartis de façon aléatoire. Toutefois, selon Nagare et Mukherji [345], la présente préparation de la solution d'APTES à pH 5 peut favoriser la densité de groupement amine du silane. Cette condition, ajoutée à l'activation des groupes carboxyles de l'anticorps par l'EDC pourrait expliquer la différence d'immobilisation des molécules d'anticorps lorsque l'APTES ou le GPTMS ont été utilisés pour la modification de surface. En comparaison avec d'autres études telles que celle de Lei et Leung [346], le seuil de détection de cet immunocapteur à base d'APTES, qui est capable de détecter les formes traitées (VBNC) de *L. pneumophila*, était équivalent à 10 UFC/mL au lieu de 10^4 UFC/mL.

La spécificité du présent anticorps monoclonal a été préalablement testée par Allegra et al. [112], qui ont démontré que l'anticorps monoclonal immobilisé sur des billes magnétiques ne pouvait pas détecter plus de 2% à 10% des suspensions pures de *Pseudomonas aeruginosa*. Lors d'un essai dans notre premier papier [257], aucune reconnaissance significative

apparente (selon les mesures EIS) entre l'anticorps anti-*L. pneumophila* et les souches appartenant aux genres *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus* n'a été observée.

Dans le présent travail, la spécificité du biocapteur a été de nouveau testée à l'aide de deux bactéries qui souvent coexistent avec *L. pneumophila* dans les milieux aquatiques : *Enterococcus faecalis* (figure 48) et *Escherichia coli* (figure 49).

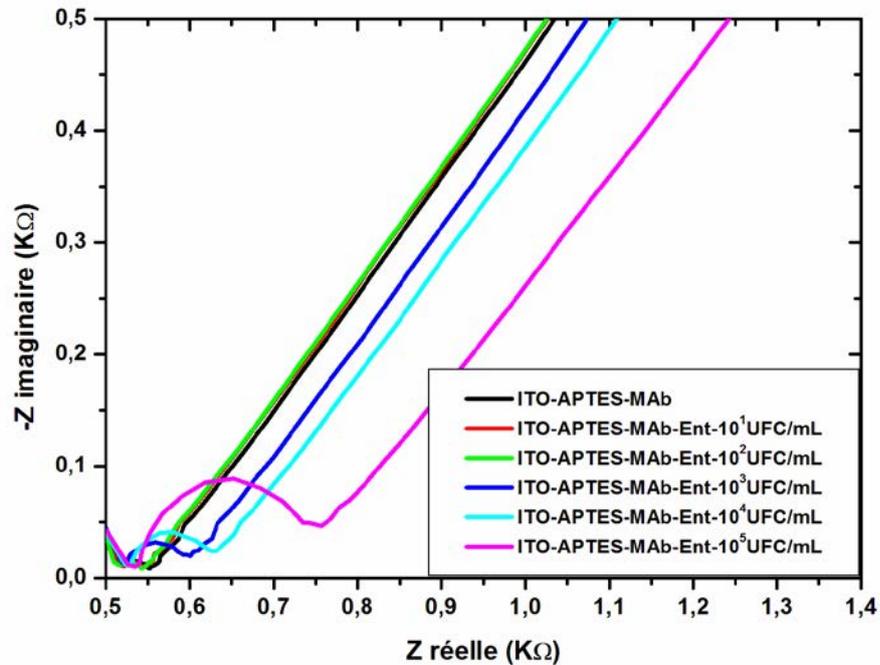


Figure 48 : Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance électrochimique après l'immobilisation des anticorps (ITO-APTES-MAb) et la détection d'*Enterococcus faecalis* (10¹ UFC/mL, 10² UFC/mL, 10³ UFC/mL, 10⁴ UFC/mL et 10⁵ UFC/mL)

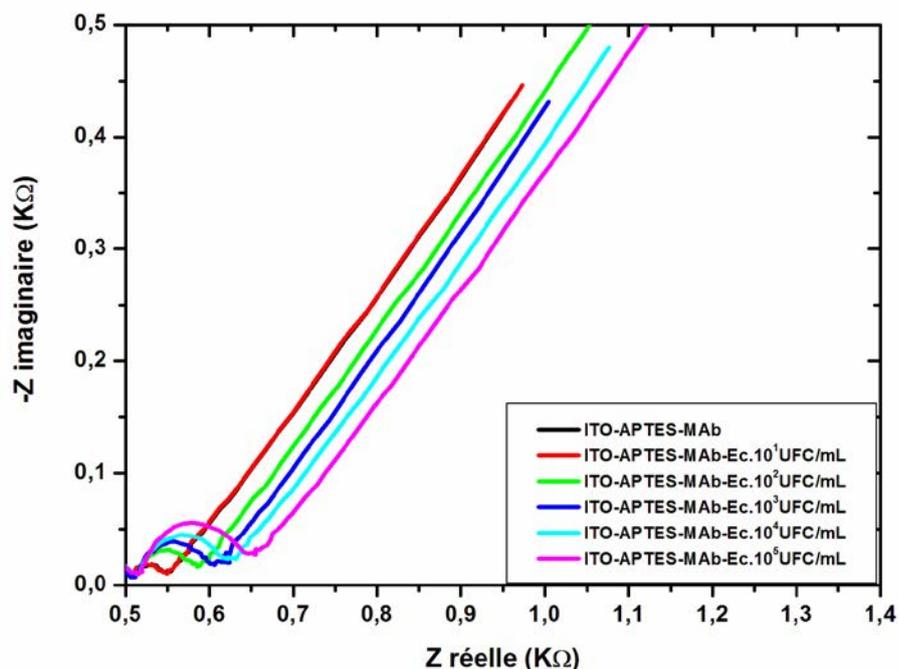


Figure 49 : Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance électrochimique après l'immobilisation des anticorps (ITO-APTES-MAb) et la détection d'*Escherichia coli* (10^1 UFC/mL, 10^2 UFC/mL, 10^3 UFC/mL, 10^4 UFC/mL et 10^5 UFC/mL)

Les électrodes modifiées par l'anticorps ont été exposées à des concentrations croissantes de chaque bactérie. Comme on le voit sur la figure 50, aucune détection significative de ces deux bactéries n'a été atteinte, même si une légère réaction croisée avec *Enterococcus faecalis* peut être observée pour des concentrations supérieures à 10^4 UFC/mL.

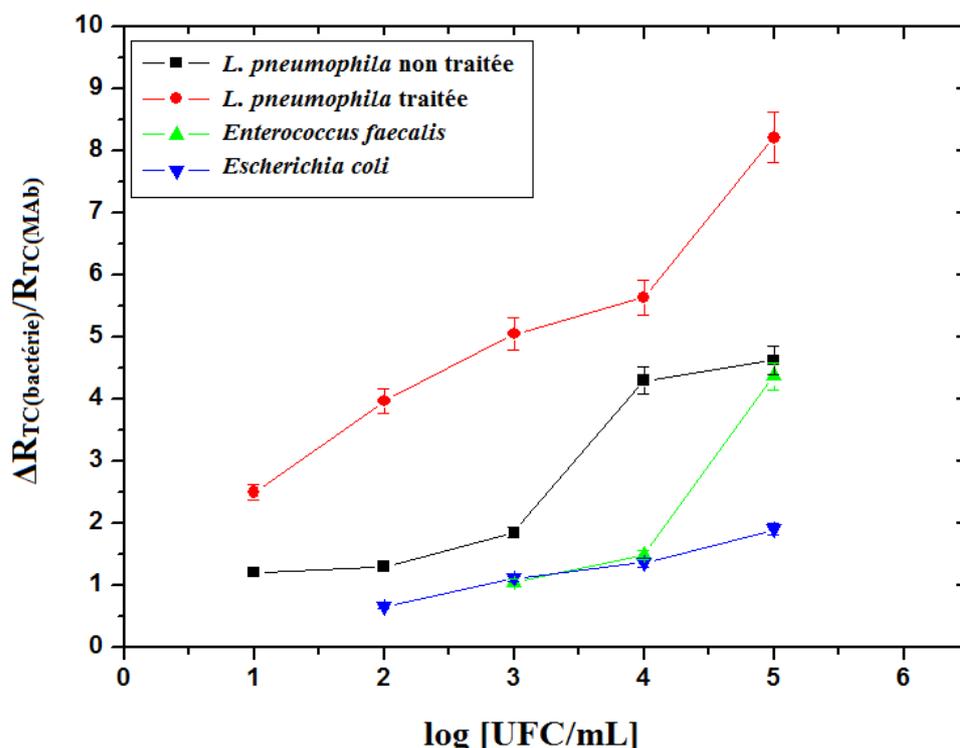


Figure 50 : Variation relative de la R_{TC} en fonction des valeurs logarithmiques des concentrations de formes non traitées de *L. pneumophila* (courbe rouge), de formes traitées de *L. pneumophila* (courbe noire), *Enterococcus faecalis* (courbe verte) et *Escherichia coli* (courbe bleue)

III. Evaluation de l'immunocapteur dans sa version APTES sur des échantillons environnementaux réels :

Afin de prévenir les infections engendrées par les légionelles, le développement de technologies permettant la détection rapide et « in situ » suivie d'une identification rapide des différentes formes vivantes de ces bactéries à partir des sources aquatiques environnementales est devenue une priorité pour les autorités sanitaires.

La technique électrochimique basée sur l'utilisation d'un immunocapteur à base d'aminosilane (APTES), pour la détection de *L. pneumophila* dans les échantillons environnementaux, a été entreprise dans cette étude.

Pour déterminer la validité de cette approche, nous avons évalué le capteur sur 34 échantillons d'eau chaude sanitaire, qui avaient préalablement été testés en utilisant la technique conventionnelle (culture sur milieu spécifique selon la Norme AFNOR NF T90-431 de septembre 2003).

La figure 51 montre la variation relative de la résistance de transfert de charge ($\Delta R_{TC} / R_{TC}$) en fonction de la concentration des bactéries en coordonnées semi-logarithmiques. Les résultats représentent la moyenne de 5 mesures pour chaque concentration étudiée : sans bactéries comme témoin négatif, et 10^2 , 10^4 et 10^6 UFC/mL comme des témoins positifs.

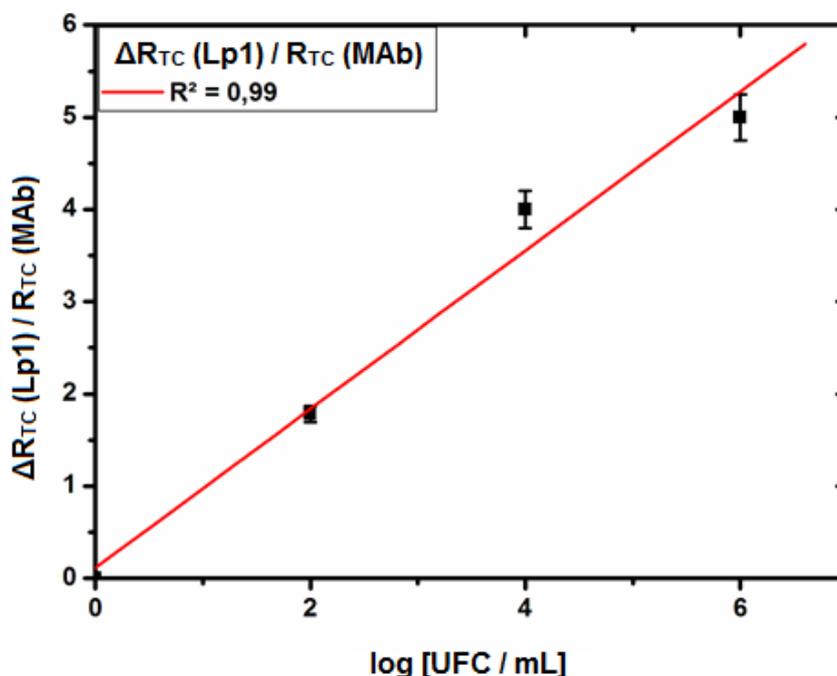


Figure 51 : Variation relative de la R_{TC} en fonction du logarithme de la concentration de bactéries viable *L. pneumophila* sg1 (en UFC mL⁻¹)

Cette courbe d'étalonnage a été utilisée pour quantifier les bactéries *L. pneumophila* dans les échantillons réels à partir des mesures électrochimiques effectuées en double sur chaque échantillon. Les résultats des mesures électrochimiques sont exprimés en UFC mL⁻¹, qui seront convertis en UFC L⁻¹ (dans le tableau 7) pour pouvoir les comparer avec les résultats de la culture (qui sont exprimés en UFC L⁻¹). La moyenne des résultats est présentée dans le tableau 7.

Tableau 7 : Moyenne de la variation relative de la résistance de transfert de charge et concentrations des bactéries *L. pneumophila* dans différents échantillons réels

| Echantillon | | $\Delta R_{TC} (L.p) / R_{TC}$ (MAb) | Concentration de <i>L. pneumophila</i> déterminée par mesures électrochimiques (UFC L ⁻¹) | Concentration de <i>L. pneumophila</i> déterminée par culture (NF T90-431) (UFC L ⁻¹) |
|-------------|--------------------------------|---|---|--|
| Hôpital 1 | 1 (bassin mitigé) | 0.35 | 2 10 ³ | < 250 (non détecté) |
| Hôpital 2 | 2 (retour eau chaude, 46.5 °C) | 0.8 | 8 10 ³ | 400 Lp1 |
| | 3 (point de purge) | 1.74 | 10 ⁵ | < 250 (non détecté) |
| Hôpital 3 | 4 (retour eau chaude, 51.5 °C) | 1.3 | 3 10 ⁴ | 1.5 10 ³ Lp2-14 |
| | 5 (sortie eau chaude, 60 °C) | 1.2 | 2 10 ⁴ | < 250 (non détecté) |
| | 6 (eau froide, 7°C) | 7.3 | > 10 ⁸ | 10 ⁴ Lp2-14 |

| | | | | |
|------------------|--|------|-------------------|----------------------------|
| | 7 (pommelle de douche, 1^{er} jet, 30 °C) | 1.3 | 3 10 ⁴ | 1.5 10 ³ Lp2-14 |
| | 8 (pommelle de douche, 1^{er} jet, 39 °C) | 2.44 | 6 10 ⁵ | 4 10 ³ Lp2-14 |
| | 9 (pommelle de douche, 1^{er} jet, 45 °C) | 0.75 | 5 10 ³ | < 250 (non détecté) |
| | 10 (eau chaude) | 1 | 10 ⁴ | < 250 (non détecté) |
| Hôpital 4 | 11 (eau chaude) | 2 | 2 10 ⁵ | 500 Lp1 |
| | 12 (eau chaude) | 2 | 2 10 ⁵ | 1.5 10 ⁴ Lp1 |
| | 13 (eau chaude pommelle de douche) | 0.65 | 4 10 ³ | < 250 (non détecté) |
| Hôpital 5 | 14 (eau chaude pommelle de douche) | 2 | 2 10 ⁵ | < 250 (non détecté) |
| | 15 (eau chaude pommelle de douche) | 0.6 | 4 10 ³ | < 250 (non détecté) |
| Hôpital 6 | 16 (eau chaude pommelle de douche) | 0.4 | 2 10 ³ | < 250 (non détecté) |

| | | | | |
|------------------|--|-------|------------------|-------------------------|
| | 17 (eau chaude pommelle de douche) | 0.17 | Pas de bactéries | < 250 (non détecté) |
| Hôpital 7 | 18 (eau chaude) | 0.35 | $2 \cdot 10^3$ | < 250 (non détecté) |
| | 19 (eau chaude) | < 0.1 | Pas de bactéries | < 250 (non détecté) |
| | 20 (eau chaude) | 0 | Pas de bactéries | < 250 (non détecté) |
| Hôpital 8 | 21 (eau chaude sanitaire, sortie chaude) | 3 | $3.6 \cdot 10^7$ | < 250 (non détecté) |
| | 22 (eau chaude sanitaire, retour de boucle) | 2.5 | $8 \cdot 10^5$ | $5.5 \cdot 10^4$ Lp2-14 |
| | 23 (vanne de purge, fond de ballon) | 2 | $2 \cdot 10^5$ | < 250 (non détecté) |
| | 24 (eau chaude sanitaire) | 3.5 | 10^7 | < 250 (non détecté) |
| | 25 (eau chaude sanitaire) | 1 | 10^4 | < 250 (non détecté) |
| | 26 (eau chaude sanitaire) | 1 | 10^4 | < 250 (non détecté) |

| | | | | |
|------------------|--|------|----------------|-----------------------|
| | 27 (tour de refroidissement, 12°C) | 0.3 | $2 \cdot 10^3$ | 300 (Lp1 + Lp2-14) |
| Hôpital 9 | 28 (sortie eau chaude de ballon, 2^{ème} jet) | 0.47 | $3 \cdot 10^3$ | < 250 (non détecté) |
| | 29 (retour boucle eau chaude sanitaire) | 2.5 | 10^6 | < 250 (non détecté) |
| | 30 (eau chaude sanitaire, vanne de purge, fond ballon, 2^{ème} jet) | 0.5 | $3 \cdot 10^3$ | < 250 (non détecté) |
| | 31 (eau chaude sanitaire, 2^{ème} jet) | 1.3 | $3 \cdot 10^4$ | < 250 (non détecté) |
| | 32 (eau chaude sanitaire, 2^{ème} jet) | 2 | $2 \cdot 10^5$ | < 250 (non détecté) |
| | 33 (eau chaude sanitaire, 2^{ème} jet) | 1.75 | 10^5 | < 250 (non détecté) |
| | 34 (départ eau glacée, tour aéro-réfrigérante) | 0.75 | $5 \cdot 10^3$ | 10^4 (Lp1 + Lp2-14) |

Les 34 échantillons examinés dans cette étude proviennent de 9 hôpitaux différents.

Sur la base des résultats électrochimiques des 34 échantillons testés, 31 se sont avérés contenir des *L. pneumophila*.

Parmi ces 31 échantillons positifs, 5 échantillons seulement étaient positifs à la culture pour *L. pneumophila* sg1, dont 2 (les échantillons 27 et 34) montraient une culture mixte de *L. pneumophila* sg1 et *L. pneumophila* non-sg1 (le nombre exact des colonies de chaque sérotype n'a pas été déterminé par la culture vu l'impossibilité de différencier l'aspect des colonies des deux sérotypes, cela nécessite le passage à un test d'agglutination avec les sérums de groupes). Dans tous les cas de positivité de la culture, les concentrations bactériennes détectées par l'immunocapteur sont toujours plus élevées. La caractérisation des sérotypes de *L. pneumophila* est en relation avec l'épitope membranaire lipopolysaccharide (LPS). Dans ce travail, on a utilisé l'anticorps monoclonal DP-Lp1-O2 dirigé contre le LPS de *L. pneumophila* sg1 [112]. Les valeurs plus élevées des mesures électrochimiques par rapport à la culture pour ces deux échantillons (les échantillons 27 et 34) peuvent être dues à la possibilité que l'anticorps croise avec les épitopes des *L. pneumophila* non-sg1 présentes dans l'échantillon, ce qui suggérerait des épitopes du LPS de séquences et/ou structures très proches entre sérotypes de *L. pneumophila*.

Les 26 autres échantillons étaient négatifs en culture pour *L. pneumophila* sg1.

Parmi ces 26 échantillons, 5 (les échantillons 4, 6, 7, 8 et 22) ont montré la présence de *L. pneumophila* non-sg1 en culture. Il reste possible, pour ces échantillons, que les boîtes de culture renfermaient des colonies de *L. pneumophila* sg1 qui n'ont pas été identifiées parce que les *L. pneumophila* non-sg1 étaient plus nombreuses et qu'elles sont difficilement distinguables des colonies *L. pneumophila* sg1 (l'agglutination avec les sérums de groupes pour leur identification se faisant selon l'aspect des colonies).

Dans les 21 autres échantillons, aucune colonie de *Legionella* n'a été détectée par l'intermédiaire de la norme AFNOR NF T90-431 de septembre 2003. L'absence des formes cultivables de *L. pneumophila* sur le milieu de culture n'élimine pas la possibilité de la présence des bactéries VBNC ou mortes dans l'échantillon. En effet, les résultats de la cytométrie (comme présentés précédemment dans la figure 43) montrent qu'une suspension bactérienne peut contenir des formes de *L. pneumophila* viables et cultivables, des VBNC et des bactéries mortes. Les cellules mortes avec membrane encore intacte peuvent être détectées par l'anticorps, parce qu'elles présentent toujours l'épitope sur la membrane. Les valeurs des

mesures électrochimiques peuvent aussi être alors expliquées par la présence de *L. pneumophila* mortes à membranes toujours intactes.

Parmi les 34 échantillons testés, 3 (les échantillons 17, 19 et 20) présentent des résultats négatifs par les deux techniques d'analyse (l'immunocapteur et la culture). En effet, les résultats électrochimiques ont montré que, si la variation relative est d'environ 0.1, la bactérie est considérée comme absente (le Nyquist de la concentration bactérienne est presque identique à celui de l'anticorps). Dans ce cas, les échantillons testés ne contiennent aucune *L. pneumophila*.

Un test de régénération d'immunocapteur aurait dû avoir lieu au cours de la validation de biocapteur. En détachant les bactéries détectées par l'immunocapteur (par rupture de liaison épitope/paratope), le sérotype de *L. pneumophila* pourrait être identifié par culture sur milieu spécifique suivie par un test d'agglutination par exemple ou toute autre technique permettant d'avoir une identification taxonomique (PCR par exemple).

Tous ces résultats pris ensemble suggèrent que la technique électrochimique présente une sensibilité supérieure à la culture, ce qui peut être expliqué par : (i) soit que l'échantillon contient les deux formes vivantes de *Legionella* (viable et cultivable et VBNC) ou des *Legionella* mortes à membranes intactes si les deux techniques montrent des résultats positifs, (ii) soit que l'échantillon ne contient que des formes VBNC de *L. pneumophila* sg1 ou des *Legionella* mortes à membranes intactes si la culture montre des résultats négatifs pour *L. pneumophila* sg1, (iii) soit que l'anticorps croise avec des LPS d'autres sérotypes que celui de *L. pneumophila* sg1 si l'échantillon contient les deux sérotypes de *L. pneumophila* (résultats de la culture) et l'électrochimie révèle des résultats positifs pour *L. pneumophila*.

Nos résultats suggèrent donc que notre biocapteur à base d'anticorps monoclonaux spécifiques a la capacité de quantifier *L. pneumophila* dans les échantillons environnementaux, ce qui laisse envisager son intérêt comme méthode de surveillance dans l'évaluation du risque environnemental lié à cette espèce.

Conclusion générale

Ce travail avait comme objectif l'immuno-détection électrochimique de *L. pneumophila*, depuis leur habitat naturel (échantillons environnementaux). L'idée était d'évaluer les performances de deux versions d'immunocapteur dans ce contexte. Il s'est agi de modifier la surface d'une électrode semi-conductrice (ITO), matériel peu honoreux, par deux silanes différents permettant la fixation de molécules d'anticorps spécifiques, et d'étudier la reconnaissance entre anticorps-bactéries. L'efficacité de la modification de surface ainsi que cette reconnaissance permettant d'élaborer des immunocapteurs pour détecter et quantifier *L. pneumophila* et de vérifier si - dans le cas de la version APTES - celle-ci était capable de reconnaître des formes stressées telles que de VBNC obtenues après un traitement thermique de 70°C pendant 30 min mimant ainsi les préconisations en terme de contrôle de légionelles dans les réseaux (OMS).

Nous avons commencé par le nettoyage des électrodes d'ITO suivant un protocole à base de KOH (pour planifier la surface) et de RCA (pour créer des groupements hydroxyles). Cette étape primordiale assurait non seulement le nettoyage des électrodes mais les préparait pour une étape suivante de modification par des silanes.

L'efficacité de protocole de nettoyage était tout d'abord vérifiée par des méthodes physicochimiques (mouillabilité, EIS, CV), ainsi qu'une méthode microscopique (AFM).

Par la suite, pour détecter des formes non traitées de bactéries, nous avons modifié les électrodes d'ITO par un époxysilane (GPTMS). Sa fixation covalente sur la surface, était assurée par les groupements hydroxyles de la surface. En se fixant sur la surface d'ITO, ces molécules de GPTMS étaient arrangées en monocouches auto-assemblées (SAMs). Cette étape était aussi caractérisée par la méthode d'AFM et les méthodes physicochimiques.

L'étape suivante était consacrée à l'immobilisation des molécules d'anticorps. Des IgG monoclonales spécifiques de *L. pneumophila* étaient utilisées (anticorps dont nous avons l'exclusivité mondiale). Nous avons vérifié l'immobilisation de ces anticorps sur les surfaces d'ITO fonctionnalisées, par liaison covalente, par la technique de microscopie à force atomique et les méthodes physicochimiques. Ces anticorps anti-*L. pneumophila* étaient capables de détecter ces bactéries par affinité, et ceci était aussi vérifié par les différentes techniques utilisées au cours de notre travail.

La deuxième partie de ce travail était consacrée à la détection de *Legionella* traitées par choc thermique (70 °C pendant 30 min), pour créer des formes viables mais non cultivables (VBNC). L'efficacité de traitement des échantillons était contrôlée par la technique de cytométrie en flux, qui est capable de quantifier les différentes formes des bactéries présentes dans l'échantillon, ainsi que par la culture sur milieu sélectif (croissance des seules formes viables et cultivables).

Après l'étape de nettoyage, des électrodes d'ITO étaient fonctionnalisées par des monocouches auto-assemblées d'aminosilane (APTES). L'utilisation d'un aminosilane assurait une meilleure orientation des molécules d'anticorps lors de leur immobilisation sur les surfaces des électrodes. Afin de mieux vérifier l'immobilisation des molécules de MAb, des méthodes physicochimiques ainsi que microscopiques étaient utilisées. La technique de microscopie confocale était utilisée, après une immobilisation d'anticorps fluorescents anti-anticorps contre *L. pneumophila* dans le but de suivre la localisation des anticorps contre *L. pneumophila* sur les surfaces fonctionnalisées. L'étape de la détection de différentes concentrations, était suivie par la microscopie confocale, ainsi que la spectroscopie d'impédance électrochimique.

La technique de la culture sur amibes, était utilisée pour valider que les formes VBNC générées après traitement thermique (lesquelles étaient déposées sur le capteur en version APTES) étaient susceptibles d'être ressuscitées. La technique de PCR quantitative en temps réel était utilisée pour contrôler la qualité des concentrations des suspensions de *L. pneumophila* (vérification des concentrations totales en *L. pneumophila*) avant et après le traitement thermique.

La spécificité de notre anticorps monoclonal DP-Lp1-O2 utilisé, était confirmée après exposition de l'immunocapteur élaboré à des bactéries co-existantes avec *L. pneumophila* dans les échantillons environnementaux réels comme les eaux chaudes sanitaires.

La troisième partie était réservée à la validation de la technique de détection électrochimique de *L. pneumophila* (version APTES du capteur) sur des échantillons réels. 34 milieux réels étaient analysés, à la fois, par culture selon la norme AFNOR NF T90-431 de Septembre 2003 et par électrochimie. Les résultats suggèrent que le capteur dans cette version, est bien capable de détecter l'ensemble des formes bactériennes présentant une intégrité de l'épitope cible de l'anticorps que ce soient :

- des formes VBNC générées après choc thermique ;

- des formes viables cultivables ;
- des formes mortes qui n'ont pas encore perdu leur intégrité membranaire et sur lesquelles l'anticorps est susceptible de reconnaître les épitopes non encore dégradés.

Globalement, les deux capteurs sont capables de détecter *L. pneumophila* avec des seuils de sensibilité remarquables qui ne diffèrent pas d'une version à l'autre. L'utilisation du capteur en version APTES reste à privilégier dans la mesure où il sera vraisemblablement moins soumis que le capteur en version GPTMS à un phénomène de saturation (les deux valences réactionnelles de l'anticorps sont accessibles dans la version APTES).

Enfin la version APTES a permis, de façon remarquable, de maintenir un seuil de détection bas tout en réduisant la concentration d'anticorps immobilisés à sa surface.

L'enjeu reste, concernant cette problématique de capteurs à légionelles, de valider leur utilisation :

- pour d'autres espèces de légionelles (sous réserve que des anticorps spécifiques soient disponibles pour ceci) ;
- sur des supports éventuellement plus reproductibles ou standardisés que l'ITO (électrodes sérigraphiées par exemple dont certaines sont pré-fonctionnalisées industriellement y compris avec des espèces chimiques stables au cours du temps comme des nanotubes de carbone ou des nanoparticules d'or par exemple).

La sensibilité risque d'être néanmoins difficile à augmenter puisqu'il reste impossible de détecter, par l'intermédiaire d'anticorps, moins d'une cellule vivante. La détection des seules formes vivantes (y compris VBNC) par ces capteurs reposera vraisemblablement sur l'utilisation combinée de marqueurs de viabilité ou de molécules plus prometteuses comme les aptamères. La littérature mentionnant la capacité - pour d'autres bactéries que les légionelles - de détecter les seules formes viables par l'intermédiaire de tels réactifs.

Enfin, il n'est pas inconcevable de réfléchir à l'analyse de réseaux en temps réels via de tels capteurs ou au déploiement de systèmes microfluidiques susceptibles d'analyser de plus grands volumes pour une meilleure exhaustivité du dénombrement bactérien et/ou une meilleure représentativité d'un échantillon par rapport à l'installation dont il est extrait.

Références bibliographiques

- [1] Norme AFNOR NF T90-431 Novembre 2014 : Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* – Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation.
- [2] Maiwald, M., Kissell, K., Srimuang, S., V. K. Doeberitz, M., & Sonntagl, H. G. (1994). Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of legionellas in hospital water samples. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 216-225.
- [3] Myint, M. S., Johnson, Y. J., Tablante, N. L., & Heckert, R. A. (2006). The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiology*, 23, 599-604.
- [4] Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beechmam, H. J., Sharrar, R. G., Harris, J., Mallison, G. F., Martin, S. M., McDade, J. E., Shepard, C. C., & Brachman, P. S. (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 297, 1189-1197.
- [5] McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A., & Dowdle, W. R. (1977). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New England Journal of Medicine*, 297, 1197-1203.
- [6] McDade, J. E., Brenner, D. J., & Bozeman, F. M. (1979). Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Annals of Internal Medicine*, 90, 659-661.
- [7] Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., & McDade, J. E. (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila* genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Annals Internal Medicine*, 90, 656-658.
- [8] Cazalet, C., Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Lomma, M., Dervins-Ravaule, D., Newton, H. J., Sansom, F. M., Jarraud, S., Zidane, N., Ma, L., Bouchier, C., Etienne, J., Hartland, E. L., & Buchrieser, C. (2010). Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLOS Genetics*, 6, e1000851.

- [9] Stout, J. E., Rihs, J. D., & Yu, V. L. (2003). *Legionella* In: Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen J. H., Tenover, M. C. & Tenover, R. H. (ed.). *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, DC, 2, 809-823.
- [10] Jarraud, S., Reyrolle, M., & Etienne, J. (2000). *Legionella* et légionellose. In: Freney, J., Renaud, F., Hansen, F., Hansen, W., Bollet, C., eds. *Précis de bactériologie clinique*. Paris : ESKA, 1389-1405.
- [11] Squinazi, F., & Nahapetian, K. (1988). *Legionella pneumophila* : méthodes de recherche chez l'homme et dans l'environnement. *Revue Française des Laboratoires*, 172 : 33-41.
- [12] Benson, R. F., & Fields, B. S. (1998). Classification of the genus *Legionella*. *Seminars in Respiratory Infections*, 13, 90-99.
- [13] Fliermans, C. B. (1996). Ecology of *Legionella*: From Data to Knowledge with a Little Wisdom. *Microbial Ecology*, 32, 203-228.
- [14] Mintz, C. S., Chen, J. X., & Shuman, H. A. (1988). Isolation and characterization of auxotrophic mutants of *Legionella pneumophila* that fail to multiply in human monocytes. *Infection and Immunity*, 56: 1449-1455.
- [15] Moss, C. W., Karr, D. E., & Dees, S. B. (1981). Cellular fatty acid composition of *Legionella longbeachae* sp. *Journal of Clinical Microbiology*, 14, 692-694.
- [16] Diogo, A., Veríssimo, A., Nobre, M. F., & da Costa, M. S. (1999). Usefulness of fatty acid composition for differentiation of *Legionella* species. *Journal Clinical Microbiology*, 37, 2248-2254.
- [17] Chen, D. J., Procop, G. W., Vogel, S., Yen-Lieberman, B., & Richter, S. S. (2015). Utility of PCR, Culture, and antigen detection methods of diagnosis of legionellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 53, 3474-3477.
- [18] Zuravleff, J. J., Yu, V. L., Shonnard, J. W., Rihs, J. D., & Best, M. (1983). *Legionella pneumophila* contamination of a hospital humidifier. Demonstration of aerosol transmission and subsequent subclinical infection in exposed guinea pigs. *American Review of Respiratory Disease*, 128, 657-661.
- [19] Yu, M., He, L., Guo, Y., & Li Y. (2015). *Legionella pneumophila* contamination in cooling tower water of central air conditioning systems in public places in Zhongshan. *Journal of Environmental Hygiene*, 2, 116-119.

- [20] Brooks, T., Osicki, R., Springthorpe, V., Sattar, S., Filion, L., Abrid, D., & Riffard, S. (2004). Detection and identification of *Legionella* species from groundwaters. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 67, 1845-1859.
- [21] Che, D., Campèse, C., & Jarraud, S. (2009). Légionelles et légionellose : qu'a-t-on découvert depuis 30 ans ? *Pathologie Biologie*, 59, 134-136.
- [22] Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C., Stout, J. E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Health, C. M., Paterson, D. L., & Cheresky, A. (2002). Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *Journal of Infectious Diseases*, 186, 127-128.
- [23] Helbig, J. H., Bernander, S., Castellani Pastoris, M., Etienne, J., Gaia, V., Lauwers, S., Lindsay, D., Luck, P. C., Marques, T., Mentula, S., Peeters, M. F., Pelaz, C., Struelens, M., Uldum, S. A., Wewalka, G., & Harrison, T. G. (2002). Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 21, 710-716.
- [24] Bouvet, E. (2006). La légionellose. *Médecine science*, 22, 601-606.
- [25] Burke, P. T., Shah, R., Thabalingam, R., & Saba, S. (2009). Suspected *Legionella*-induced perimyocarditis in an adult in the absence of pneumonia. *Texas Heart Institute Journal*, 36, 601-603.
- [26] Cianciotto, N. P. (2001). Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology*, 291, 331-343.
- [27] Heuner, K., Dietrich, C., Skriwan, C., Sternert, M., & Hacker, J. (2002). Influence of the alternative sigma (28) factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 70, 1604-1608.
- [28] Gabay, J. E., Blake, E. M., Niles, W. D. & Horowitz, M. A. (1985). Purification of *Legionella pneumophila* major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *Journal of Bacteriology*, 162, 85-91.
- [29] Dowling, J. N., Saha, A. K., & Glew, R. H. (1992). Virulence factors of the family Legionellaceae. *Microbiology Reviews*, 56, 32-60.
- [30] Steinert, M., Hentschel, U., & Hacker, J. (2002). *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 149-162.

- [31] Garduno, R. A., Garduno, E., & Hoffman P. S. (1998). Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infection and Immunity*, 66, 4602-4610.
- [32] Reichardt, K., Jacobs, S., Roske, I., & Helbig, J. H. (2010). *Legionella pneumophila* carrying the virulence-associated lipopolysaccharide epitope possesses two functionally different LPS components. *Microbiology*, 156, 2953-2961.
- [33] Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881-890.
- [34] Soderberg, M. A., Rossier, O., & Cianciotto, N. P. (2004). The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. *Journal of Bacteriology*, 186, 3712-3720.
- [35] Stone, B. J., & 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, 1395-1402.
- [36] Dietrich, P., Sanders, D., & Hedrich, R. (2001). The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1959–1967.
- [37] Merriam, J. J., Mathur, R., M. Boumil, R. & Isberg, R. R. (1997). Analysis of the *Legionella pneumophila* fliI gene: intracellular growth of a defined mutant defective for flagellum biosynthesis. *Infection and Immunity*, 65, 2497-2501.
- [38] Vogel, J. P., & Isberg, R. R. (1999). Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 30-34.
- [39] A. Kwaik, Y., Gao, L. Y., J. Stone, B., Venkataraman, C., & S. Harb, O. (1998). Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in Bacterial Ecology and pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3127-3133.
- [40] L. Barona, J., Harris, J. K., P. Holinger, E., Duda, S., J. Stevens, M., E. Robertson, C., A. Ross, K., R. Pace, N., & E. Stout, J. (2015). Effect of monochloramine treatment on the microbial ecology of *Legionella* and associated bacterial populations in a hospital hot water system. *Systematic and Applied Microbiology*, 38, 198-205.
- [41] Epalle, T., Girardot, F., Allegra, S., Maurice-Blanc, C., Garraud, O., & Riffard, S. (2015). 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*, 69, 215-224.

[42] Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. (2005). Order VI. Legionellales. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), New York: Springer, 2, 210.

[43] Correia, A. M., Ferreira, J. S., Borges, V., Nunes, A., Gomes, B., Capucho, R., Gonçalves, J., Antunes, D. M., Almeida, S., Mendes, A., Guerreiro, M., Sampaio, D. A., Vieira, L., Machado, J., Simoes, M. J., Gonçalves, P. & Gomes, J. P. (2016). Probable person-to-person transmission of legionnaires disease. *New England Journal of Medicine*, 374, 497-498.

[44] (CSHPF), Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. (2005). *Le risque lié aux légionelles - Guide d'investigation et d'aide à la gestion*, Paris

[45] Levi Y. (2001). Ecologie microbienne des réseaux d'eau potable et risque microbiologique : l'exemple de *Legionella pneumophila*. *Revue Française des Laboratoires*, 336, 33-37.

[46] Ohno, M., Sakamoto, H., Yasuda, K., Okada, T. S., & Shimura, Y. (1985). Nucleotide sequence of a chicken delta-crystallin gene. *Nucleic Acids Research*, 13, 1593-1606.

[47] Jarraud, S., Reyrolle, M., Malmeret, M., Lina, G., Vandenesch, F., & Etienne, J. (2000). Légionelles : modalités d'application de la circulaire DGS n° 98/771 du 31 Décembre 1998 concernant la présence de *Legionella* dans l'eau. *Lettre de l'Infectiologue*, 15, 62-65.

[48] Straus, W. L., Plouffe, J. F., File, T. M. Jr., Lipman, H. B., Hackman, B. H., Salstrom, S. J., Benson, R. F., & Breiman, R. F. (1996). Risk factors for domestic acquisition of legionnaires disease. Ohio legionnaires Disease Group. *Archives of Internal Medicine*, 156, 1685-1692.

[49] Leoni, L., Rampioni, G., Stefano, V. D., & Zennaro, E. (2005). Dual role of response regulator StyR in styrene catabolism regulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5411-5419.

[50] States, S. J., Conley, L. F., Ceraso, M., Stephenson, T. E., Wolford, R. S., Wadowsky, R. M. (1985) Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Applied and Environmental Microbiology* 50 (5): 1149-1154

- [51] Ohno, A., Kato, N., Yamada, K., & Yamaguchi, K. (2003). Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2540-2547
- [52] Katz, S. M., & Hammel, J. M. (1987). The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 17, 150-6
- [53] Surman-Lee, S., Fields, B., Hornei, B., Ewig, S., Exner, M., Tartakovsky, I., Lajoie, L., Dangendorf, F., Bentham, R., Cabanes, P. A., Fourier, P., Trouvet, T., & Wallet, F. (2007). Ecology and environmental sources of *Legionella*. In: Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S (ed.). *Legionella and the prevention of legionellosis*, WHO Press, Geneva, 29-38
- [54] Fliermans, C. B., Cherry, W. B., Orrison, L. H., Smith, S. J., Tison, D. L., & Pope, D. H. (1981). Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 9-1.
- [55] Declerck, P. (2010). Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology*. 12, 557-566.
- [56] Lee, H. J., Ho, M. R., Bhuwan, M., Hsu, C. Y., Huang, M. S., Peng, H. L., & Chang, H. Y. (2010). Enhancing ATP-based bacteria and biofilm detection by enzymatic pyrophosphate regeneration. *Analytical Biochemistry*, 399, 168-173.
- [57] Murga, R., Forster, T. S., Brown, E., Pruckler, J. M., Fields, B. S., & Donlan, R. M. (2001). Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology*, 147, 3121-3126.
- [58] Weissenberger, A., C., Cazalet, C., & Buchrieser, C. (2007). *Legionella pneumophila*-human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 432-448.
- [59] Fields, B. S., Benson, R. F., & Besser, R. E. (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 506–526.
- [60] Bozue, J. A., & Johnson, W. (1996). Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome lysosome fusion. *Infection and Immunity*, 64, 668-673.

- [61] Declerck, P., Behets, J., De Keersmaecker, B. and Ollevier, F. (2007). Receptor-mediated uptake of *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2697-2703.
- [62] Harf, C., & Monteil, H. (1988). Interactions between free-living amoebae and *Legionella* in the environment. *Water Science Technology*, 20, 235-239.
- [63] Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J., & Lévi, Y. (2004). *Amoebae* in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 950-963.
- [64] Philippe, C., Blech, M. F., & Hartemann, P. (2006). Intra-amoebal development of *Legionella pneumophila* and the potential role of amoebae in the transmission of legionnaires' disease. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 36, 196-200.
- [65] Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M. H., & Héchard, Y. (2007). Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environmental Microbiology*, 9, 1341-1344.
- [66] Neumeister, B., Reiff, G., Faigle, M., Northoff, H., & Lang, F. (2000). Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 914-919.
- [67] Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., & James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176, 2137-2142.
- [68] Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., & Ollevier, F. (2007b). Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Research*, 41, 3159-3167.
- [69] Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., & Keevil, C. W. (1994). Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1585-1592.
- [70] Green, P. N., & Pirrie, R. S. (1993). A laboratory apparatus for the generation and biocide efficacy testing of *Legionella* biofilms. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 388-393.
- [71] Green, P. N. (1993). Efficacy of biocides on laboratory-generated *Legionella* biofilms. *Letters in Applied Microbiology*, 17, 158-161.

- [72] Kuiper, M. W., Wullings, B. A., Akkermans, A. D. L., Beumer, R. R., & van der Kooij, D. (2004). Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6826-6833.
- [73] Temmerman, R., Vervaeren, H., Nosedá, B., Boon, N., & Verstraete, W. (2006). Necrotrophic Growth of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4323-4328.
- [74] Cargill, K. L., Pyle, B. H., Sauer, R. L. & McFeters, G. A. (1992). Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila*. *Canadian Journal Microbiology*, 38, 423-429.
- [75] Bitar, D. M., Molmeret, M., & A. Kwaik, Y. (2004). Molecular and cell biology of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology*, 293, 519-527.
- [76] Riffard, S., Douglass, S., Brooks, T., Springthorpe, S., Filion, L. G., & Sattar, S. A. (2001). Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. *Water Science Technology*, 43, 99-102.
- [77] Norme AFNOR NF T90-431 Septembre 2003 – Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila*. Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation.
- [78] Leoni, E., & Legnani, P. P. (2001). Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 27-33.
- [79] Pasche, A., Braunschweig, R., Fitting, J. W., P. Nicod, L. (2012). Utilité clinique du lavage bronchoalvéolaire. *Revue Médicale Suisse*, 8, 2212-8.
- [80] Rowbotham, T. J. (1983). Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via *amoebae*, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *Journal Clinical Pathology*, 36, 978–986.
- [81] G. De Luca, S. Stampi, L. Lezzi, F. Zanetti. (1999). Effect of heat and acid decontamination treatments on the recovery of *Legionella pneumophila* from drinking water using two selective media. *New Microbiologica*, 22, 203–208.
- [82] Tilton, R. C. (1979). Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Internal Medicine*, 90, 697-698.

- [83] Kohler, R. B., Zimmerman, S. E., Wilson, E., Allen, S. D., Edelstein, P. H. Wheat, L. J. & White, A. (1981). Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' disease. *Annals of Internal Medicine*, 94, 601-605.
- [84] Kashuba, A. D., & Ballow, C. H. (1996). *Legionella* urinary antigen testing: potential impact on diagnosis and antibiotic therapy. *Diagnostic Microbiology Infect Dis*, 24, 129-139.
- [85] Ruf, B. Schurmann, D., Horbach, I., Fehrenbach, F. J., & Pohle, H. D. (1990). Prevalence and diagnosis of *Legionella pneumoniae*: a 3-year prospective study with emphasis on application of urinary antigen detection. *The Journal of Infectious Diseases*, 162, 1341-1348.
- [86] Yzerman, Ed P. F., den Boer, J. W., Lettinga, K. D., Schellekens, J., Dankert, J., & Peeters, M. (2002). Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of legionnaires' disease in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3232-3236.
- [87] Blanco, S., Prat, C., Sanchez, M. D., Ferrer, D., Pellicer, T., Haba, L., Latorre, I., Vilaplana, C., Ausina, V., & Dominguez, J. (2008). Evaluation of a *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay for rapid detection of *Legionella pneumophila* in water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211, 168-171.
- [88] Guerrero, C., Toldos, C. M., Ramirez, C., Rodriguez, T., & Segovia, M. (2004). Comparison of diagnostic sensitivities of three assays (Bartels enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW immunochromatographic test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 467-468.
- [89] Diederens, B. M., & Peeters, M. F. (2006). Evaluation of two new immunochromatographic assays (Rapid U *Legionella* antigen test and SD Bioline *Legionella* antigen test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 2991-2993.
- [90] Kohler, R. B., Winn, W. C. Jr, & Wheat, L. J. (1984). Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 20, 605-607.
- [91] Sopena, N., Sabria, M., P. Botet, M. L., Reynaga, E., G. Nunez, M., Dominguez, J., & Matas, L. (2002). Factors related to persistence of *Legionella* urinary antigen excretion in patients with legionnaires' disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 21, 845-848.

- [92] Helbig, J. H., Uldum, S. A., Bernander, S., Luck, P. C., Wewalka, G., Abraham, B., Gaia, V., & Harrison, T. G. (2003). Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 838–840
- [93] Kim, M. J., Sohn, J. W., Park, D. W., Park, S. C. & Chun, B. C. (2003). Characterization of a lipoprotein common to *Legionella* species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of legionnaires' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2974-2979.
- [94] La Scola, B., Mezi, L., Weiller, P. J., & Raoult, D. (2001). Isolation of *Legionella anisa* using an amoebic coculture procedure. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 365–366.
- [95] Stokes, G. G., (1852). On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 142, 463-562.
- [96] Plouffe, J. F., File, T. M., Breiman, R. F., Hackman, B. A., Salstrom, S. J., Marston, B. J., & Fields, B. S. (1995). Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. *Clinical Infectious Diseases*, 20, 1286-1291.
- [97] Kallings, I., & Nordström, K. (1983). The Pattern of Immunoglobulins with Special Reference to IgM in Legionnaires' Disease Patients During a 2 Year Follow-up Period. *Medical microbiology, infectious diseases and parasitology*, 255, 27-32.
- [98] Wang, H. H., Chiou, T. W., & Hsu, J. P. (1987). Anaerobic saccharolytic bacterial adhesion to raw starch granules. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 1122-1126.
- [99] Collins, C. H., Grange, J. M., & Yates, M. D. (1984). Mycobacteria in water. *Journal of Applied Bacteriology*, 57, 193-211.
- [100] Ricketts, K. D., & Joseph, C. A. (2007). Legionnaires disease in Europe: 2005-2006. *Eurosurveillance*, 12, E7-8.
- [101] Morio, F., Corvec, S., Caroff, N., Le Gallou, F., Drugeon, H., & Reynaud, A. (2008). Real-time PCR assay for the detection and quantification of *Legionella pneumophila* in environmental water samples: utility for daily practice. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211, 403-411.
- [102] Lubana, S., Christine, R., Isabelle, P., Jacques, C., & Max, M. (2013). Intérêt diagnostique et pronostique de la PCR en temps réel chez les patients atteints de légionellose. *Sympolegio, Legionella de l'environnement à l'homme*.

- [103] Yaradou, D. F., H. Soulier, S., Moreau, S., Poty, F., Hillion, Y., Reyrolle, M., André, J., Festoc, G., Delabre, K., Vandenesch, F., Etienne, J., & Jarraud, S. (2007). Integrated Real-Time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1452-1456.
- [104] Joly, P., Falconnet, P. A., André, J., Weill, N., Reyrolle, M., Vandenesch, F., Maurin, M., Etienne, J., & Jarraud, S. (2006). Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water Samples: data interpretation. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2801-2808.
- [105] Binet, M., Baudart, J., Mercier, A., T. Bodilis, A., Guillaume, C., Lebaron, P. (2011). Développement d'une méthode rapide pour la quantification de *Legionella* spp dans les eaux environnementales en 48 heures par la méthode FISH ScanRDITM. *Sympolegio, Legionella de l'environnement à l'homme*.
- [106] Buchbinder, R., Ptasznik, R., Gordon, J., Prabakaran, V., & Forbes, A. (2002). Ultrasound-guided extracorporeal shock wave therapy for plantar fasciitis: a randomized controlled trial. *Journal of American Medical Association*, 288, 1364-1372.
- [107] Wilks, S. A., & Keevil, C. W. (2006). Targeting species-specific low affinity 16S rRNA binding sites by using peptide nucleic acids for detection of legionellae in biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 72:5453–5462.
- [108] Olsvik, O., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, K. S., Hornes, E., Ugelstad, J., & Uhlen, M. (1994). Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 43-54.
- [109] Deng, M. Q., Lam, K. M., & Cliver, D. O. (2000). Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using MACS MicroBeads and high gradient separation columns. *Journal of Microbiological Methods*, 40, 11-17.
- [110] Sasaki, K., Tajiri, Y., Sata, M., Fujii, Y., Matsubara, F., Zhao, M., Shimizu, S., Toyonage, A., & Tanikawa, K. (1999). *Helicobacter pylori* in the natural environment. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 31, 275-279.
- [111] Wang, X., & Slavik, M. F. (1999). Rapid detection of *Salmonella* in chicken washes by immunomagnetic separation and flow cytometry. *Journal of Food Protection*, 62, 717-723.
- [112] Allegra, S., Girardot, F., Grattard, F., Berthelot, P., Helbig, J. H., Pozzetto, B., & Riffard, S. (2011b). Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with

cultivation to improve *Legionella pneumophila* serogroup 1 recovery from environmental samples. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 952–961

[113] (CSHPF), Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. (2001). Projet de décret relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles (3^{ème} version).

[114] Allegra, S., Berger, F., Berthelot, P., Grattard, F., Pozzetto, B., & Riffard, S. (2008). Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 7813–7816.

[115] Schmidt, R. (1999). Comportement des matériaux dans les milieux biologiques: applications en médecine et biotechnologie. Volume 7 de *Traité des matériaux*. PPUR presses polytechniques, p. 210.

[116] Doré, M. (1989). *Chimie des oxydants et traitement des eaux*. Lavoisier, p.237.

[117] Audisio, S. & Béranger, G. (2010). *Anticorrosion et durabilité dans le bâtiment, le génie civil et les ouvrages industriels*. PPUR Presses polytechniques, p. 471.

[118] 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.

[119] Mustapha, P., Epalle, T., Allegra, S., Girardot, F., Garraud, O., & Riffard, S. (2015). Monitoring of *Legionella pneumophila* viability after chlorine dioxide treatment using flow cytometry. *Research in Microbiology*, 1-5.

[120] Yabuchi, E., Wang, L., Yamayoshi, T., Arakawa, M., & Yano, I. (1995). Bactericidal effect of chlorine on strains of *Legionella* species. *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 69, 151-157.

[121] Srikanth, S., & Berk, S. G. (1993). Adaptation of amoebae to cooling tower biocides. *Microbial Ecology*, 27, 293-301.

[122] Kilvington, S., & Price, J. (1990). Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 519-525.

[123] Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbiol Ecology*, 8, 313-323.

- [124] Oliver, J. D. (1993). Formation of viable but non-culturable cells. Starvation in bacteria, Plenum Press, New York, 239-272.
- [125] Besnard, V., Federighi, M., Declercq, E., Jugiau, F., & Cappelletti, J. M. (2002). Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Research*, 33, 359–370.
- [126] Wong, H. C., & Wang, P. (2004). Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 359–366.
- [127] Maalej, S., Denis, M., & Dukan, S. (2004). Temperature and growth-phase effects on *Aeromonas hydrophila* survival in natural seawater microcosms: role of protein synthesis and nucleic acid content on viable but temporarily nonculturable response. *Microbiology*, 150, 181–187
- [128] Cook, K. L., & Bolster, C. H. (2007). Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 573-583.
- [129] Asakura, H., Kawamoto, K., Haishima, Y., Igimi, S., Yamamoto, S., & Makino S. I. (2008). Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Research in Microbiology*, 159, 709–717.
- [130] Chiu, S. W., Chen, S. Y., & Wong, H. C. (2008). Localization and expression of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* under different stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 7016-7022.
- [131] Kana, B. D., Gordhan, B. G., Downing, K. J., Sung, N., Vostroktunova, G., Machowski, E. E., et al. (2008). The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth *in vitro*. *Molecular Microbiology*, 67, 672–684.
- [132] Beumer, R. R., de Vries, J., & Rombouts, F. M. (1992). *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 153-163.
- [133] Lindbäck, T., Rottenberg, M. E., Roche, S. M., & Rørvik, 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, 08.

- [134] Zhong, L., Chen, J., Zhang, X., and Jiang, Y. (2009). Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into viable but nonculturable state and its resuscitation. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 247–252.
- [135] Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 415–425.
- [136] Day, A. P., & Oliver, J. D. (2004). Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but non-culturable state. *Journal of Microbiology*, 42, 69–73.
- [137] Citterio, B., Casaroli, A., Pierfelici, L., Battistelli, M., Falcieri, E., & Baffone, W. (2004). Morphological changes and outer membrane protein patterns in *Helicobacter pylori* during conversion from bacillary to coccoid form. *New Microbiology*, 27, 353-360.
- [138] Signoretto, C., Lleò, M., & Canepari, P. (2002). Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Current Microbiology*, 44, 125-131.
- [139] Heim, S., Del Mar Lleo, M., Bonato, B., Guzman, C. A., & 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, 6739-6745.
- [140] Muela, A., Seco, C., Camafeita, E., Arana, I., Orruño, M., López, J. A., et al. (2008). Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiology Ecology*, 64, 28–36.
- [141] Lai, C. J., Chen, S. Y., Lin, I., Chang, C. H., & Wong H. C. (2009). Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 118–124.
- [142] Nilsson, L., Oliver, J. D., & Kjelleberg, S. (1991). Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Journal of Bacteriology*, 173, 5054–5059.
- [143] Mukamolova, G. V., Kaprelyants, A. S. & Kell, D. B. (1995). Secretion of an antibacterial factor during resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 67, 289-295.
- [144] Barrett, T. (1998). An investigation into the molecular basis of the viable but non-culturable response in bacteria. PhD Thesis, University of Aberdeen

- [145] F. L. Saux, M., Hervio, H. D., Loaec, S., Colwell, R. R., & Pommepey, M. (2002). Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 5641-5646.
- [146] Pai, S. R., Actor, J. K., Sepulveda, E., Hunter, R. L., Jr., & Jagannath, C. (2000). Identification of viable and non-viable *Mycobacterium tuberculosis* in mouse organs by directed RT-PCR for antigen 85B mRNA. *Microbial Pathogenesis*, 28, 335-342.
- [147] Adams, B. L., Bates, T. C., & Oliver, J. D. (2003). Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7462-7466.
- [148] Boaretti, M., Lleò, M. M., Bonato, B., Signoretto, C., & Canepari, P. (2003). Involvement of rpoS in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. *Environmental Microbiology*, 5, 986-996.
- [149] Oliver, J. D., & Bockian, R. (1995). *In vivo* resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2620-2623.
- [150] Rahman, M. A., Zaher, M., Mazid, M. A., Haque, M. Z., & Mahata, S. C. (1996). Replacement of costly fish meal by silkworm pupae in diet of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 39, 64-67.
- [151] Sun, F., Chen, J., Zhong, L., Zhang, X.-H., Wang, R., Guo, Q., et al. (2008). Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiology Ecology*, 64, 37-44.
- [152] Barer, M. R. (1997). Viable but non-culturable and dormant bacteria: time to resolve an oxymoron and a misnomer? *Journal of Medical Microbiology*, 46, 629-631
- [153] Bogosian, G., Morris, P. J. L., & O'Neil, J. P. (1998). A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1736-1742.
- [154] Bogosian, G., & Bourneuf, E. V. (2001). A matter of bacteria life and death. *EMBO Reports*, 2, 770-774.
- [155] Nystrom, T. (2001). Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Archives of Microbiology*, 176, 159-164.

- [156] Garcia, M. T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R. D., & A. Kwaik, Y. (2007). *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environmental Microbiology*, 9, 1267-1277.
- [157] Barcina, I., & Arana, I. (2009). The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 8, 245–255.
- [158] Colwell, R. R. (2009). Viable but Not Cultivable Bacteria. *Uncultivated Microorganisms*. 121-129.
- [159] Trevors, J. (2011). Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: gene expression in planktonic and biofilm cells. *Journal of Microbiological Methods*, 86, 266–273.
- [160] Davey, H. M., & Kell, D. B. (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations—the importance of single-cell analyses. *Microbiology Reviews*, 60, 641–696.
- [161] Kell, D. B. A., Kaprelyants, S., Weichart, D. H., Harwood, C.R., & Barer, M.R. (1998). Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Leeuwenhoek*, 73, 169-187.
- [162] McDougald, D., Rice, S. A., Weichart, D., & Kjelleberg, S. (1998). Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology*, 25, 1-9.
- [163] Caron, G. N. V., & Badley, R. A. (1995). Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. *Journal of Microscopy*, 179, 55–66.
- [164] Joux, F., & Lebaron, P. (2000). Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*, Institut Pasteur, 2, 1523–1535.
- [165] Ueckert, J., Breeuwer, P., Abee, T., Stephens, P., von Caron, G.N., & ter Steeg, P.F. (1995). Flow cytometry applications in physiological study and detection of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 317–326.
- [166] Langsrud, S., & Sundheim, G. (1996). Flow cytometry for rapid assessment of viability after exposure to a quaternary ammonium compound. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 411–418.

- [167] Millard, P. J., Roth, B. L., Thi, H. P., Yue, S. T., & Haugland, R. P. (1997). Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*, 2897–2905.
- [168] Berglund, D. L., Taffs, R. E., & Robertson, N. P. (1987). A rapid analytical technique for flow cytometric analysis of cell viability using calcofluor white M2R. *Cytometry*, *8*, 421–426.
- [169] Auger, J., Leonce, S., Jouannet, P., & Ronot, X. (1993). Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Official Journal of the Histochemistry Society*, *41*, 1247–1251.
- [170] Gant, V. A., Warnes, G., Phillips, I., & Savidge, G. F. (1993). The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *Journal of Medical Microbiology*, *39*, 147–154.
- [171] Deere, D., Shen, J., Vesey, G., Bell, P., Bissinger, P., & Veal, D. (1998). Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. *Yeast Chichester England*, *14*, 147–160.
- [172] Niven, G. W., & Mulholland, F. (1998). Cell membrane integrity and lysis in *Lactococcus lactis*: the detection of a population of permeable cells in post-logarithmic phase cultures. *Journal of Applied Microbiology*, *84*, 90–96.
- [173] Haugland, R.P. (1996). *Handbook of fluorescent probes and research chemicals (Molecular Probes)*.
- [174] Novo, D., Perlmutter, N. G., Hunt, R. H., & Shapiro, H. M. (1999). Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique. *Cytometry*, *35*, 55–63.
- [175] Waggoner, A. (1976). Optical probes of membrane potential. *Journal of Membrane Biology*, *27*, 317–334.
- [176] Salma, E., Shuhaimi, M., Mehrnoush, A., A. Manap, M. Y., Ismail, A., & Faridah, A. Bioconversion of daidzein to equol by *Bifidobacterium breve* 15700 and *Bifidobacterium longum* BB536. *Journal of Functional Foods*, *4*, 736-745.

- [177] Aeschbacher, M., Reinhardt, C.A., & Zbinden, G. (1986). A rapid cell membrane permeability test using fluorescent dyes and flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology*, 2, 247-255.
- [178] Malacriono, P., Zapparoli, G., Torriani, S., & Dellaglio, F. (2001). Rapid detection of viable yeast and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiol Methods*, 45, 127-134.
- [179] Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., G. Dumas, E., S. L. Grand, A., & Alexandre, H. Characterization of the "viable but nonculturable" (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology*, 30, 438-447.
- [180] Sboui, D., Souiri, M., Reynaud, S., Palle, S., B. Ismail, M., Epalle, T., Mzoughi, R., Girardot, F., Allegra, S., Riffard, S., & Othmane, A. (2015). Characterisation of electrochemical immunosensor for detection of viable not-culturable forms of *Legionella pneumophila* in water samples. *Chemical papers*, 69, 1402-1410.
- [181] M. Cabral, F., & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. As agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 273-307.
- [182] Greub, G., & Raoult, D. (2003). Morphology of *Legionella pneumophila* according to their location within *Hartmannella vermiformis*. *Research in Microbiology*, 154, 619-621.
- [183] Rowbotham, T. J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for fresh water and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology*, 33, 1179-1183.
- [184] Harb O.S., Venkataraman C., Haack B.J., Gao L.Y. et Kwaik Y.A. (1998) Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 126-132.
- [185] Venkataraman, C., Haack, B. J., Bondada, S., & A. Kwaik, Y. (1997). Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the legionnaires' disease bacterium. *The Journal of Experimental Medicine*, 186, 537-547.
- [186] Venkataraman, C., Gao, L. Y., Bondada, S., & A. Kwaik, Y. (1998). Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the legionnaires'

disease bacterium, *Legionella pneumophila*. The Journal of Experimental Medicine, 188, 505-514.

[187] Molmeret, M., Bitar, D. M., Han, L., & Kwaik, Y. A. (2004). Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. Microbes and Infection, 6, 129-139.

[188] A. Kwaik, Y. (1996). The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. Applied and Environmental Microbiology, 62, 2022-2028.

[189] Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G., & Roy, C. R. (2001). How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms in into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. Journal of Cell Science, 114, 4637-4650.

[190] Swanson, M. S., & Hammer, B. K. (2000). *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. Annual Review of Microbiology, 54, 567-613.

[191] Harb, O. S., Gao, L. Y., & A. Kwaik, Y. (2000). From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. Environmental Microbiology, 2, 251-265.

[192] Gao, L. Y., & Kwaik, K. A. (2000). The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. Trends in Microbiology, 8, 306-313.

[193] Anand, C. M., Skinner, A. R., Malic, A., & Kurtz, J. B. (1983). Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). Journal of Hygiene, 91, 167-178.

[194] Berk, S. G., Ting, R. S., Turner, G. W., & Ashburn, R. J. (1998). Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. Applied and Environmental Microbiology, 64, 279-286.

[195] Rowbotham, T. J. (1986). Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. Israel Journal of Medical Sciences, 22, 678-689.

[196] Rai, V., Nyine, Y. T., C. Hapuarachchi, H., Yap, H. M., Ng, L. C., & Toh, C. S. (2012). Electrochemically amplified molecular beacon biosensor for ultrasensitive DNA sequence-specific detection of *Legionella* sp. Biosensors and bioelectronics, 32, 133-140.

- [197] Rai, V., Deng, J., & Toh, C. S. (2012). Electrochemical nanoporous alumina membrane-based label-free DNA biosensor for the detection of *Legionella* sp. *Talanta*, 98, 112-117.
- [198] Park, E. J., Lee, J. Y., Kim, J. H., Lee, C. J., Kim, H. S., & Min, N. K. (2010). Investigation of plasma-functionalized multiwalled carbon nanotube film and its application of DNA sensor for *Legionella pneumophila* detection. *Talanta*, 82, 904-911
- [199] M. Paredes, G., G. Garcia, M. B., & C. Garcia, A. (2010). Genosensor for detection of four pneumonia bacteria using gold nanostructured screen-printed carbon electrodes as transducers. *Sensors and actuators B: Chemical*, 149, 329-335.
- [200] Park, E. J., Lee, J. Y., Kim, J. H., Kim, S. K., Lee, C. J., & Min, N. K. (2010). Electrochemical Characterization of O₂ plasma functionalized multi-walled carbon nanotube electrode for *Legionella pneumophila* DNA sensor. *Japanese journal of applied physics*, 49, 08JH01.
- [201] M. Castro, R., D. L. S. Alvarez, & L. Castanon, M. J. (2009). PCR-coupled electrochemical sensing of *Legionella pneumophila*. *Biosensors and bioelectronics*, 24, 2390-2396.
- [202] M. Castro, R., L. Castanon, M. J., J. M. Ordieres, A., & T. Blanco, P. (2008). Stem-Loop DNA Probes for the voltammetric determination of *Legionella pneumophila* on disposable screen-printed gold electrodes.
- [203] Park, J., You, X., Jang, Y., Nam, Y., Kim, M. J., Min, N. K., & Park, J. J. (2014). ZnO nanorod matrix based electrochemical immunosensors for sensitivity enhanced detection of *Legionella pneumophila*. *Sensors and actuators B : Chemical*, 200, 173-180.
- [204] Lin, H. Y., Tsao, Y. C., Tsai, W. H., Yang, Y. W., Yan, T. R., & Sheu, B. C. (2007). Development and application of side-polished fiber immunosensor based on surface plasmon resonance for the detection of *Legionella pneumophila* with halogens light and 850 nm-LED. *Sensors and actuators A: Physical*, 138, 299-305.
- [205] Bae, Y. M., Oh, B. K., Lee, W., Lee, W. H., & Choi, J. W. (2004). Immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* based on imaging ellipsometry. *Materials science and engineering: C*, 24, 61-64.

- [206] Cooper, I. R., Meikle, S. T., Standen, G., Hanlon, G. W., & Santin, M. (2009). The rapid and specific real-time detection of *Legionella pneumophila* in water samples using Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy. *Journal of microbiological methods*, 78, 40-44.
- [207] Lei, K. F., & Leung, P. H. M. (2012). Microelectrode array biosensor for the detection of *Legionella pneumophila*. *Microelectronic engineering*, 91, 174-177.
- [208] Enrico, D. L., G. Manera, M., Montagna, G., Cimaglia, F., Chiesa, M., Poltronieri, P., Santino, A., & Rella, R. (2013). SPR based immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* in water samples. *Optics communications*, 294, 420-426.
- [209] Oh, B. K., Kim, Y. K., Lee, W., Bae, Y. M., Lee, W. H., & Choi, J. W. (2003). Immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* using surface plasmon resonance. *Biosensors and bioelectronics*, 18, 605-611.
- [210] Li, N., Brahemendra, A., Veloso, A. J., Prashar, A., Cheng, X. R., Hung, V. W. S., Guyard, C., Terebiznik, M., & Kerman, K. (2012). Disposable immunochips for the detection of *Legionella pneumophila* using electrochemical impedance spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 84, 3485–3488.
- [211] Wolter, A., Niessner, R., & Seidel, M. (2008). Detection of *Escherichia coli* O157 :H7, *Salmonella typhimurium*, and *Legionella pneumophila* in water using a flox-through chemiluminescence microarray readout system. *Analytical Chemistry*, 80, 5854-5863.
- [212] C. Clark Jr., L., & Lyons, C. (1962). Electrodes Systems for monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of New York Academy of sciences*, 102, 29-45.
- [213] Updike, S. J., & Hicks, G. P. (1967). The Enzyme Electrode. *Nature*, 214, 986-988.
- [214] Guilbault, G. G., & Montalvo, J. G. Jr. (1969). A urea-specific enzyme electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 91, 2164-2165.
- [215] Guilbault, G. G., & Montalvo, J. G. Jr. (1969). An improved urea specific enzyme electrode, *Analytical Letters*, 2, 283-293.
- [216] Georges, A. (1993), *Les capteurs en instrumentation industrielle*, Edition : 4, Publié par Dunod, 816 pages.
- [217] Yang, Y. T., Callegari, C., Feng, X. L., Ekinici, K. L., & Roukes, M. L. (2006). Zeptogram-scale nanomechanical mass sensing. *Nano Letters*, 6, 583-586.

- [218] Dejous, C. (2005). Contribution à l'étude de microcapteurs à ondes acoustiques visant la biodétection rapide sur site. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I. p. 126
- [219] Li, M., Tang, H. X., & Roukes, M. L. (2007). Ultra-sensitive NEMS-based cantilever for sensing, scanned probe and very high-frequency applications. *Nature Nanotechnology*, 2, 114-120.
- [220] Maraldo, D., Rijal, K., Campbell, G., & Mutharasan R. (2007). Method for label-free detection of femtogram quantities of biologics in flowing liquid samples. *Analytical Chemistry*, 79, 2762-2770.
- [221] Spivey, R. S., Davies, G., & Matthews, D. R. (2005). Patient evaluation of a pen-sized glucose meter. *Practical Diabetes International*, 5, 204-206.
- [222] Nomura, Y., Chee, G. J., & Karube I. (1998). Biosensor technology for determination of BOD. *Field Analytical Chemistry Technology*, 2, 333-340.
- [223] Karube, I., & Nomura, Y. (2000). Enzyme sensors for environmental analysis. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*, 10, 177-181.
- [224] Donald, V., & Judith, G. V. (1998). Biochimie, de Boeck Université, Bruxelles.
- [225] Tran-Minh, C. (1991). Les biocapteurs. Principes, construction et application. Edition Masson, Paris, 1-158.
- [226] Tran-Minh, C., & Broun, G. (1973). Utilisation des électrodes à pression partielle de gaz carbonique pour la mesure spécifique de l'urée en solution. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris. Séries D*, 276, 2215-2217.
- [227] Anh Tuan Mai. Développement des biocapteurs électrochimiques à base de tyrosinase pour la détection des polluants organiques en phase aqueuse, Thèse de doctorat de l'université de Claude Bernard - Lyon 1, N° d'ordre : 194-2004.
- [228] Dugas, V., Depret, G., Chevalier, Y., Nesme, X., Souteyrand, E. (2004). Immobilization of single-stranded DNA fragments to solid surfaces and their repeatable specific hybridization: covalent binding or adsorption? *Sensors Actuators B Chem.*, 101, 112-121.
- [229] Mehrvar, M., & Abdi, M. (2004). Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical sciences*, 20, 1113-1126.

- [230] Palecek, E., Fojta, M. (2001). Detecting DNA hybridization and damage. *Analytical chemistry*, 73, 74A-83A.
- [231] Scheller, F. W., Wollenberger, U., Warsinke, A., & Lisdat, F. (2001). Research and development in biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 35-40.
- [232] Bidan, G., Billon, M., Livache, T., Mailley, P., & Roget A. (2003). Ingénierie et électrochimie moléculaires pour la conception de puces à ADN, l'actualité chimique : Molécules et matériaux d'intérêt médical, novembre-décembre 2003.
- [233] Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346, 818-822.
- [234] Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249, 505-510.
- [235] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263-273.
- [236] Iliuk, A.B., Hu, L. & Tao, W. A. (2011). Aptamer in bioanalytical applications. *Analytical Chemistry*, 83, 4440-4452.
- [237] Luzi, E., Minunni, M., Tombelli, S., & Mascini, M. (2003). New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22, 810-818.
- [238] Tombelli, S., Minunni, M., & Mascini, M. (2005). Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2424-2434.
- [239] Liu, J., Cao, Z., & Lu, Y. Functional nucleic acid sensors. (2009). *Chemical Reviews*, 109, 1948-1998.
- [240] Tombelli, S., Minunni, M., & Mascini, M. (2007). Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomolecular Engineering*, 24, 191-200.
- [241] Dickey, F. H. (1949). The preparation of specific adsorbents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 35, 227-229.
- [242] Ramström, O., & Mosbach, K. (1999). Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 759-764.

- [243] Takagishi, T., & Klotz, I. M. (1972). Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages. *Biopolymers*, 11, 483-491.
- [244] Poma, A., Anthony, Turner, P. F. T., & Piletsky, S. A. (2010). Advanced in the manufacture of MIP nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 28, 629-637.
- [245] Sellergren, B., Lepistoe, M., & Mosbach, K. (1988). Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition. *Journal of the American Chemical Society*, 110, 5853-5860.
- [246] Wulff, G., & Schauhoff, S. (1991). Enzyme-analog-built polymers. 27. Racemic resolution of free sugars with macroporous polymers prepared by molecular imprinting. Selectivity dependence on the arrangement of functional groups versus spatial requirements. *The Journal of Organic Chemistry*, 56, 395-400.
- [247] Vasapollo, G., Mele, G., & Del Sole, R. (2011). Cardanol-based materials as natural precursors for olefin metathesis. *Molecules*, 16, 6871-6882.
- [248] Bosseboeuf, A., Gilles, J. P., Danaie, K., Yahiaoui, R., Dupeux, M., Puissant, J. P., Chabrier, A., Fort, F., & Cotes, P. (1999). *Proceedings of the SPIE Microsystems, Metrology and Inspection Congress*.
- [249] Schroeder Jr., H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, S41-S52.
- [250] Ehlich, A., Schaal, S., Gu, H., Kitamura, D., Muller, W., & Rajewsky, K. (1993). Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. *Cell*, 72, 695-704.
- [251] Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., & Stall, A. M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement, *Cell* 68, 855-867.
- [252] Loffert, D., Ehlich, A., Muller, W., & Rajewsky, K. (1996). Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development. *Immunity*, 4, 133-144.

- [253] Novotny, J., Bruccoleri, R., Newell, J., Murphy, D., Haber, E., & Karplus, M. (1983.) Molecular anatomy of the antibody binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 14433-14437.
- [254] Marks, R.S., Novoa, A., Thomassey, D., & Cosnier, S. (2002). An innovative strategy for immobilization of receptor proteins on to an optical fiber by use of poly(pyrrole-biotin). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374, 1056-1063.
- [255] Armes, S. P. (1987). Optimum reaction conditions for the polymerization of pyrrole by iron (III) chloride in aqueous solution. *Synthetic Metals*, 20, 365-371.
- [256] Novak, P. (1992). Limitation of polypyrrole synthesis in water and their causes. *Electrochimica Acta*, 37, 1227-1230.
- [257] Souiri, M., Blel, N., Sboui, D., Mhamdi, L., Epalle, T., Mzoughi, R., Riffard, S., & Othmane A (2014). AFM, CLSM and EIS characterization of the immobilization of antibodies on indium–tin oxide electrode and their capture of *Legionella pneumophila*. *Talanta*, 118, 224–230.
- [258] Braiek, M., Bekir Rokbani, K., Chrouda, A., Mrabet, B., Bakhrouf, A., Maaref, A., & Jaffrezic-Renault, N. (2012). An electrochemical immunosensor for detection of *Staphylococcus aureus* bacteria based on immobilization of antibodies on self-assembled monolayers-functionalized gold electrode. *Biosensors*, 2, 417–426.
- [259] Ayela, C., Roquet, F., Valera, L., Granier, C., Nicu, L., & Pugnère, M. (2007). Antibody-antigenic peptide interactions monitored by SPR and QCM-D. A model for SPR detection of IA-2 autoantibodies in human serum. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 3113-3119.
- [260] Parekh, B. S., Pau, C. P., Kennedy, M. S., Dobbs, T. L., & McDougal, J. S. (2001). Assessment of antibody assays for identifying and distinguishing recent from long-term HIV Type 1 infection. *AIDS Research & Human Retroviruses*, 17, 137–146.
- [261] Lee, H. J., Namkoong, K., Cho, E. C., Ko, C., Park, J. C., & Lee, S. S. (2009) Surface acoustic wave immunosensor for real-time detection of hepatitis B surface antibodies in whole blood samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 3120–3125.
- [262] TLILI, C. (2006). Etude et réalisation de biocapteurs impédancemétriques en utilisant différentes approches d'immobilisation. Thèse de doctorat, Université paris 11.

- [263] Guedri, H. (2010). Mise au point de biocapteurs basés sur la mesure d'activités enzymatiques de cellules algales pour la surveillance des milieux aquatiques. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- [264] Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnology Advanced*, 28, 232-254.
- [265] Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Martelet, C., & J. Renault, N. (2008). Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *IRBM*. 29, 171-180.
- [266] Bardeletti, G., Sechaud, F., & Coulet, P. R. (1986). A reliable -lactate electrode with a new membrane for enzyme immobilization for amperometric assay of lactate. *Analytica Chimica Acta*, 187, 47-54.
- [267] Mizutani, F., Yamanaka, T., Tanabe, Y., & Tsuda, K. (1985). An enzyme electrode for L-lactate with a chemically-amplified response. *Analytica Chimica Acta*, 177, 153-166.
- [268] Bradley, J., & Schmid, R. D. (1991). Optimisation of the biosensor for in situ fermentation monitoring of glucose concentration. *Biosensors and Bioelectronics*, 6, 669-674.
- [269] Dempsey, E., Wang, J., Wollenberger, U., Ozsoz, M., & R. Smyth, M. (1992). A lysine dehydrogenase-based electrode for biosensing of lysine. *Biosensors and Bioelectronics*, 7, 323-327.
- [270] Marcus, R. A., & Sutin, N. (1985). Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 811, 265-322.
- [271] Sadana, A. (2002). Protein adsorption and inactivation on surface. Influence of heterogeneities. *Chemical Reviews*, 92, 1799-1818.
- [272] Caruso, F., Rodda, E., & Furlong, D. N. (1996). Orientational aspects of antibody immobilization and immunological activity on quartz crystal microbalance electrodes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 178, 104-115.
- [273] Zull, J. E., R. Mundell, J., Lee, Y. W., Vezenov, D., Ziats, N. P., Anderson, J. M., & Sukenik, C. N. (1994). Problems and approaches in covalent attachment of peptides and proteins to inorganic surfaces for biosensor applications. *Journal of Industrial Microbiology*, 13, 137-143.

- [274] Ziegler, W., Gaburjakova, J., Gaburjakova, M., Sivak, B., Rehacek, V., Tvarozek, V., & Hianik, T. (1998). Agar-supported lipid bilayers - basic structures for biosensor design. Electrical and mechanical properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 140, 357-367.
- [275] Hervás Pérez, J.P., Lopez, S. P., L. Cabarcos, E., & L. Ruiz, B. (2006). Amperometric tyrosinase biosensor based on polyacrylamide microgels. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 429-439.
- [276] Tembe, S., Inamdar, S., Haram, S., Karve, M., & D'Souza, S. F. (2007). Electrochemical biosensor for catechol using agarose-guar gum entrapped tyrosinase. *Journal of Biotechnology*, 128, 80-85.
- [277] Kurita, R., Yabumoto, N., & Niwa, O. (2006). Miniaturized one-chip electrochemical sensing device integrated with a dialysis membrane and double thin-layer flow channels for measuring blood samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1649-1653.
- [278] Védrine, C., Leclerc, J. C., Durrieu, C., & T. Minh, C. (2003). Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 457-463.
- [279] Peterman, J. H., Tarcha, P. J., Chu, V. P., & Butler, J. E. (1988). The immunochemistry of sandwich-ELISA. IV. The antigen capture capacity of antibody covalently attached to bromoacetyl surface-functionalized polystyrene. *Journal of Immunological Methods*, 111, 271-275.
- [280] Leggett, G. J., Roberts, C. J., Williams, P. M., Davies, M. C., Jackson, D. E., & Tendler, S. J. B. (1993). Approaches to the immobilization of proteins at surfaces for analysis by scanning tunneling microscopy. *Langmuir*, 9, 2356-2362.
- [281] P. Delahay, P., & Berzins, T. (1953). Theory of electrolysis at constant current with partial control by diffusion: Application to the study of complex ions. *Journal of the American Chemical Society*, 75, 2486-2486.
- [282] J. Gortemaker, B. G. M., Goverde, R. L. J., Van Knapen, F., & Bergwerff, A. A. (2002). *Journal of Immunological Methods*, 266, 33-44.
- [283] Hermel, H., & Miller, R. (1995). Effect of the secondary structure of poly- L-lysine on the adsorption at the water/dodecane interface. *Colloid & Polymer Science*, 273, 387-391.

- [284] Tang, C. S., Dusseiller, M., Makohliso, S., Heuschkel, M., Sharma, S., Keller B., & Vörös, J. (2006). Dynamic, electronically switchable surfaces for membrane protein microarrays. *Analytical Chemistry*, 78, 711-717.
- [285] T. Wink, Van Zuilen, S. J., Bult, A., & Van Bennekom, W. P. (1997). Self-assembled monolayers for biosensors. *Analyst*, 122, 43R-50R.
- [286] Flink, S., Van Veggel, F. C. J. M., & Reinhoudt, D. N. (2000). Self-assembled monolayers on gold for applications in chemical sensing. *Sensors Update*, 8, 3-19.
- [287] Kazakeviciene, B., Valincius, G., Niaura, G., Talaikyt, Z., Kaemkait, M., Razumas, V., Plauinaitis, D., Teierskien, A., & Lisauskas., V. (2007). Mediated oxidation of ascorbic acid on a homologous series of ferrocene-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir*, 23, 4965-4971.
- [288] Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., & Whitesides, G. M. (2005). Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a forms of nanotechnology. *Chemical Reviews*, 105, 1103-1169.
- [289] Porter, M. D., Bright, T. B., Allara, D. L., & Chidsey, C. E. D. (1987). Spontaneously organized molecular assembled. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *Journal of American Chemical Society*, 109, 3559-3568.
- [290] Sek, S., & Bilewicz, R. (2001). Kinetics of long-range electron transfer through alkanethiolate monolayers containing amide bonds. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 509, 11-18.
- [291] Sek, S., Misicka, A., & Bilewicz, R. (2000). Effect of interchain hydrogen bonding on electron transfer through alkanethiol monolayers containing amide bonds. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104, 5399-5402.
- [292] Kang, J. F., Liao, S., Jordan, R., & Ulman, A. (1998). Mixed self-assembled monolayers of rigid biphenyl thiol: impact of solvent and dipole moment. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 9662-9667.
- [293] Bandyopadhyay, K., Patil, V., Sastry, M., & Vijayamohan, K. (1998). Effet of geometric constraints on the self-assembled monolayer formation of aromatic disulfides on polycrystalline gold. *Langmuir*, 14, 3808-3814.

- [294] Ulman A. (1991). An introduction to ultrathin organic films. Langmuir-Blodgett to Self-Assembly, 1st Edition, Academic Press, Boxton.
- [295] Schuhmann, W. (2002). Amperometric enzyme biosensors based on optimized electron-transfer pathways and non-manual immobilization procedures. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82, 425-441.
- [296] Blankert, B., Dominguez, O., El Ayyas, W., Arcos J., & Kauffmann, J. M. (2004). Horseradish peroxidase electrode for the analysis of clozapine. *Analytical Letters*, 37, 917-928.
- [297] Davis, F., & Higson, S. P. J. (2005). Structured thin films as functional components within biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1-20.
- [298] Besson, J. (1984). Précis de thermodynamique et cinétique électrochimiques, Ellipses.
- [299] Lakowicz, J. R. (1983). Introduction to Fluorescence. Principle of Fluorescence, Plenum Press New-York, Chap1, 3-15.
- [300] Michalet, X., & Weiss, S. (2002). Single-molecule spectroscopy and microscopy. *Comptes Rendus Physique*, 3, 619–644.
- [301] CNRS/sagascience. Illustration Eric Vanneste. Le principe du microscope à fluorescence. http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/decouv/02/02_4_2/img/16.htm
- [302] Binning, G., Quate, C. F., & Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56, 930-933.
- [303] Péré, J. P. (1994). La microscopie-techniques d'étude en biologie. Collection 128, édition Nathan, Paris.
- [304] Schroder, D. K. « Semiconductor material and device characterization », 3^{ème} Edition Awiley-Interscience Publication.
- [305] Roblin, G. (1999). Microscopies optiques à balayage. *Techniques de l'Ingénieur, Traité Mesures et Contrôle*, article R6714 v1.
- [306] Cornet, A., Deville, J. P. (1998). Physique et ingénierie des surfaces. Edition EDP Sciences.
- [307] Sungdo, C., C. Lin, P., Zhu, L., Sun, P. C., & Fainman, Y. (2000). Nontranslational three-dimensional profilometry by chromatic confocal microscopy with dynamically configurable micromirror scanning. *Applied Optics*, 39, 2605-2613.

- [308] Allegra, S., Leclerc, L., Massard, P. A., Girardot, F., Riffard, S., & Pourchez, J. (2016). Characterization of aerosols containing *Legionella* generated upon nebulization. *Scientific reports*, 6, 33998.
- [309] Li, F., Chen, W., & Zhang, S. (2008). Development of DNA electrochemical biosensor based on covalent immobilization of probe DNA by direct coupling of sol-gel and self-assembly technologies. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 787-92.
- [310] Liu, Y., Li, Y., Liu, J., Deng, C., & Zhang, X. (2011). High throughput enzyme inhibitor screening by functionalized magnetic carbonaceous microspheres and graphene oxide-based MALDI-TOF-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22, 2188-2198.
- [311] Wu, Y., Chen, C., & Liu, S. (2009). Enzyme-functionalized silica nanoparticles as sensitive labels in biosensing. *Analytical Chemistry*, 15, 1600-1607.
- [312] Hang, T. C., & G. Elie, A. (2004). Frequency dependent and surface characterization of DNA immobilization and hybridization. *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 1537-1548.
- [313] Cloarec, J. P., Deligianis, N., Martin, J. R., Lawrence, I., Souteyrand, E., Polychronakos, C., Lawrence, M. F. (2002). Immobilization of homooligonucleotide probe layers onto Si/SiO₂ substrates: characterization by electrochemical impedance measurements and radiolabelling. *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 405-412.
- [314] Lim, T. K., Imai, S., & Matsunaga, T. (2002). Miniaturized amperometric flow immunoassay system using a glass fiber membrane modified with anion. *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 758-763.
- [315] Tang, J., Xu, Z., Zhou, L., Qin, H., Wang, Y., & Wang, H. (2010). Rapid and simultaneous detection of *Ureaplasma parvum* and *Chlamydia trachomatis* antibodies based on visual protein microarray using gold nanoparticles and silver enhancement. *Diagnostic Microbiology Infect Dis*, 67, 122-128.
- [316] Wong, A. K., & Krull, U. J. (2005). Surface characterization of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane films on silicon-based substrates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383, 187-200.
- [317] Ismail, M. B., Pastor, N. C., Soler, E. P., Soltani, A., & Othmane, A. (2016). A comparative study on surface treatments in the immobilization improvement of hexahistidine-

tagged protein on the indium tin oxide surface. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 7 : 372.

[318] Luzinov, I., Julthongpiput, D., Vinson, A. L., Cregger, T., Foster, M. D., & Tsukruk, V. V. (2000). Epoxy-terminated self-assembled monolayers: molecular glues for polymer layers. *Langmuir*, 16, 504-516.

[319] Ng, H. T., Fang, A. P., Huang, L., & Li, S. F. Y. (2002). Protein microarrays on ITO surfaces by a direct covalent attachment scheme. *Langmuir*, 18, 6324-6329.

[320] Zor, E., Patir, I. H., Bingol, H., & Ersoz, M. (2013). An electrochemical biosensor based on human serum albumin/graphene oxide/3-aminopropyltriethoxysilane modified ITO electrode for the enantioselective discrimination of D and L-tryptophan. *Biosensors and Bioelectronics*, 42, 321–325.

[321] Muthurasu, A., & Ganesh, V. (2012). Electrochemical characterization of self-assembled monolayers (SAMs) of silanes on indium tin oxide (ITO) electrodes-tuning electron transfer behaviour across electrode-electrolyte interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 374, 241-249.

[322] Hillebrandt, H., & Tanaka, M. (2001). Electrochemical characterization of self-assembled alkylsiloxane monolayers on indium-tin oxide (ITO) semiconductor electrodes. *Journal of Physical Chemistry B*, 105, 4270-4276.

[323] Souiri, M., Gammoudi, I., Mora, L., B. Ouada, H., Jouenne, T., Jaffrézic-Renault, N., Dejos, C., Othmane, A., & Duncan, A. C. (2012). A novel 3-D nano-assembly bacteria based biosensor for enhanced detection of heavy metal pollutants. *Journal of Environmental Science and Engineering A*, 1, 924–935.

[324] Ehret, R., Baumann, W., Brischwein, M., Schwinde, A., Stegbauer, K., & Wolf, B. (1997). *Biosensors and Bioelectronics*, 12, 29-34.

[325] Nan, L., Arujun, B., Anthony, J.V., Akriti, P., Xin, R. C., Vinci, W. S. H., Cyril, G., Mauricio, T., & Kagan, K. (2012). Disposable immunochips for the detection of *Legionella pneumophila* using electrochemical impedance spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 84, 3485-3488.

[326] Rai, V., Deng, J., & Toh, C. S. (2012). Electrochemical nanoporous alumina membrane-based label-free DNA biosensor for the detection of *Legionella* sp. *Talanta*, 98, 112-117.

- [327] Cooper, I.R., Meikle, S.T., Standen, G., Hanlon, G.W., & Santin, M. (2009). The rapid and specific real-time detection of *Legionella pneumophila* in water samples using optical waveguide lightmode spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 78, 40-44.
- [328] Li, N., Brahemendra, A., Veloso, A. J., Prashar, A., Cheng, X. R., Hung, V. W. S., Guyard, C., Terebiznik, M., & Kerman, K. (2012). Disposable immunochips for the detection of *Legionella pneumophila* using electrochemical impedance spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 84, 3485–3488.
- [329] Oliver, J. D. (2000). The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. In C. R. Bell, M. Brylinsky, & P. C. Johnson-Green (Eds.), *Microbial biosystems: New frontiers*, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, August 9–14, 1998, Halifax, Canada, (pp. 723–730). Halifax, Canada: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology.
- [330] Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of microbiology*, 43, 93-100.
- [331] Mishra, S. K., Kumar, D., Biradar, A. M., & Rajesh (2012). Electrochemical impedance spectroscopy characterization of mercaptopropionic acid capped ZnS nanocrystal based bioelectrode for the detection of the cardiac biomarker—myoglobin. *Bioelectrochemistry*, 88, 118–126.
- [332] Qin, M., Hou, S., Wang, L. K., Feng, X. Z., Wang, R., Yang, Y. L., Wang, C., Yu, L., Shao, B., & Qiao, M. Q. (2007). Two methods for glass surface modification and their application in protein immobilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60, 243–249.
- [333] Ahuja, T., Rajesh, Kumar, D., Kumar Tanwar, V., Sharma, V., Singh, N., & Biradar, A. M. (2010). An amperometric uric acid biosensor based on Bis[sulfosuccinimidyl] suberate crosslinker/3-aminopropyltriethoxysilane surface modified ITO glass electrode. *Thin Solid Films*, 519, 1128–1134.
- [334] Vashist, S. K., Dixit, C. K., MacCraith, B. D., & O’Kennedy, R. (2011). Effect of antibody immobilization strategies on the analytical performance of a surface plasmon resonance based immunoassay. *Analyst*, 136, 4431–4436.
- [335] Puertas, S., de Gracia Villa, M., Mendoza, E., Jiménez Jorquera, C., de la Fuente. J. M., Fernández-Sánchez, C., & Grazú, V. (2013). Improving immunosensor performance through

oriented immobilization of antibodies on carbon nanotube composite surfaces. *Biosensors and Bioelectronics*, 43, 274–280.

[336] Gunda, N. S. K, Singh, M., Norman, L., Kaur, K., & Mitra, S. K. (2014). Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. *Applied Surface Science*, 305, 522–530.

[337] Asenath-Smith, E., & Chen, W. (2008). How to prevent the loss of surface functionality derived from aminosilanes. *Langmuir*, 24, 12405–12409.

[338] Henke, L., & Krull, U. J. (1999). Immobilization technologies used for nucleic acid biosensors. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 44, 61–70.

[339] Bhat, R. R., Fischer, D. A. & Genzer, J. (2002). Fabricating planar nanoparticle assemblies with number density gradients. *Langmuir*, 18, 5640–5643.

[340] Yamada, K., Yoshii, S., Kumagai, S., Fujiwara, I., Nishio, K., Okuda, M., Matsukawa, N., & Yamashita, I. (2006). High-density and highly surface selective adsorption of protein–nanoparticle complexes by controlling electrostatic interaction. *Japanese journal of applied physics*, 45, 4259–4264.

[341] Bhat, R. R. & Genzer, J. (2007). Tuning the number density of nanoparticles by multivariant tailoring of attachment points on flat substrates, *Nanotechnology*, 18, 025301.

[342] Haak, R. M., Wezenberg, S. J., & Kleij, A. W. (2010). *Chemical Communications*, 46, 2713–2723.

[343] Miyamoto, H., Yamamoto, H., Arima, K., Fujii, J., Maruta, K., Izu, K., Shiomori, T., & Yoshida, S. (1997). Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2489–2494.

[344] Ng, D. L. K., Koh, B. B., Tay, L., & Heng, B. H. (1997). Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of *Legionellae* in cooling tower waters in Singapore. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 214–216.

[345] Nagare, G. D., & Mukherji, S. (2009). Characterization of silanization and antibody immobilization on spin-on glass (SOG) surface. *Applied Surface Science*, 255, 3696–3700.

[346] Lei, K. F., & Leung, P. H. M. (2012). Microelectrode array biosensor for the detection of *Legionella pneumophila*. *Microelectronic Engineering*, 91, 174–177.

Participations scientifiques

1) SympoLegio *Legionella* : de l'environnement à l'homme, Lyon, France, 26-27 Novembre 2013:

Poster (présentation par D. SBOUI) : Souiri M., Sbouï D., Blel N., Mhamdi L., Epalle T., Mzoughi R., Othmane A., & Riffard S. «AFM, CLSM and EIS characterization of the immobilization of antibodies on indium–tin oxide electrode and their capture of *Legionella pneumophila* ».

2) MADICA, Mahdia, Tunisie, 5-7 novembre 2014 :

Communication orale : D. Sbouï, M. Souiri, M. Ben Ismail, T. Epalle, R. Mzoughi, F. Girardot, S. Allegra, N. Jaffrezic, S. Riffard, & A. Othmane. « Development of an electrochemical immunosensor for the detection of *Legionella pneumophila* VBNC forms in environmental samples ».

3) Biosensing Technology, Lisbonne, Portugal, 10-13 Mai 2015:

Poster: D. Sbouï, M. Souiri, M. Ben Ismail, T. Epalle, R. Mzoughi, F. Girardot, S. Allegra, N. Jaffrezic, S. Riffard, & A. Othmane : «Electrochemical immunosensor characterization to detect viable but not culturable forms of *Legionella pneumophila* in water samples ».