

Journées ECOTECHNOLOGIES 2012

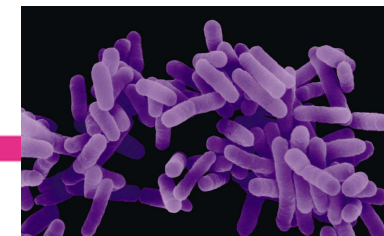
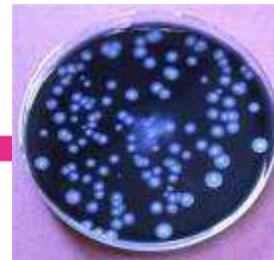
RALF
Rapid analysis of Legionella by Fluorescence

- **Precodd 2008**

Février 2009 – Juillet 2011



- Enjeu : Aujourd'hui, il n'existe aucune méthode de contrôle et d'alerte de contamination des *Legionella* pouvant être effectuée sur le terrain quasiment en temps réel (<1-2 heures), permettant ainsi de prendre des mesures correctives immédiates en cas de résultats positifs.



Contexte du projet

- **Réglementation très contraignante & Difficulté de maîtrise du risque légionelles**

ECS, TAR, établissements thermaux ...

	ECS (<i>Legionella pneumophila</i>)	TAR (<i>Legionella sp.</i>)
Niveau cible (UFC/L)	$< 10^3$	$< 10^3$
Niveau d'alerte (UFC/L)	10^3	10^3
Niveau d'action (UFC/L)	-	10^5

- **Quantification des légionelles : Outils analytiques (directs ou indirects) peu précis et réponse trop longue**

Besoin :



A la recherche d'un signal d'alarme précoce.



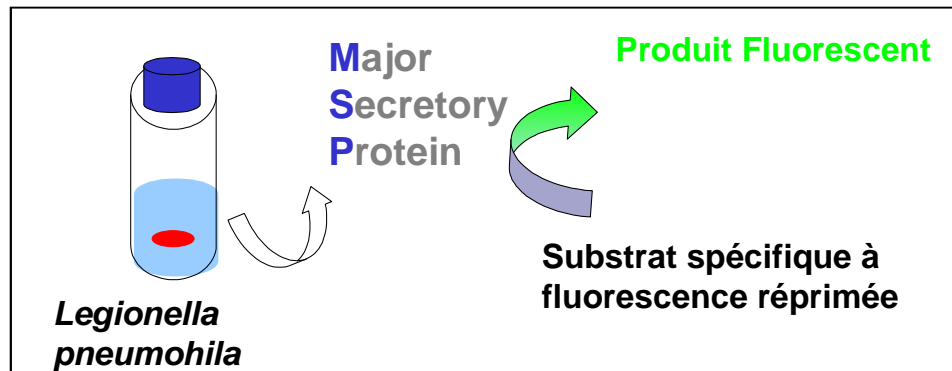
Indicateurs hydrauliques, physicochimiques ou biologiques

Fréquence et point(s) de suivi représentatif(s) des parties de l'installation « **les plus à risque de prolifération de légionelles** »

Objectifs du projet

Développement d'une solution analytique rapide (< 2h) et intégrée (valise) pour l'analyse *in situ* de *Legionella*

Développement d'un test enzymatique basé sur l'utilisation d'un substrat spécifique à fluorescence réprimée :

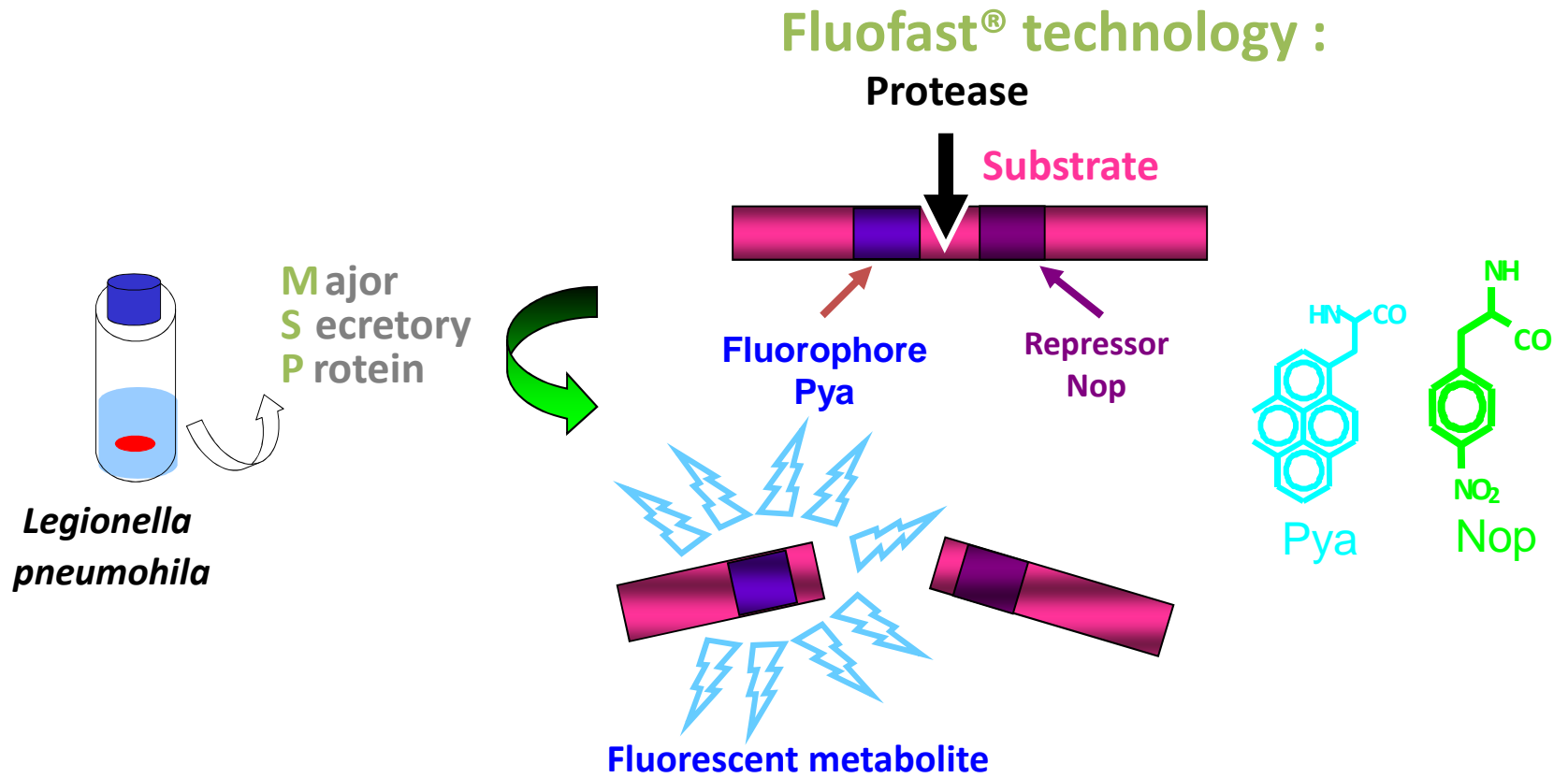


Perspectives du marché et champs d'application :

- **suivi des installations** : autocontrôle et évaluation des risques des sites industriels & publics
- **Gestion de crise** : identification des sources de contamination

Principaux résultats

- Description de l'approche choisie :



Banques de Substrat : **Ac – SKG – Pya –X(n) - Nop – GGK-NH₂**

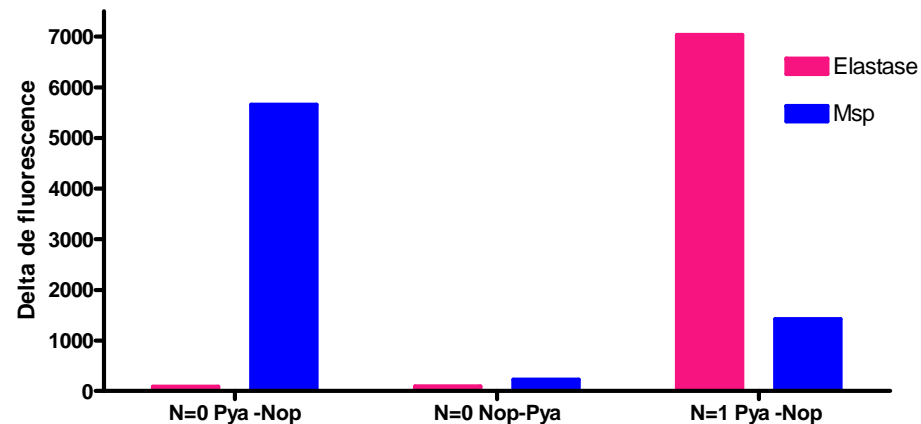
X = A, I, L, K, F, W, E, Q, T ou P, ou un mélange
n = 0 to 3

Principaux résultats

- Développement du substrat spécifique à fluorescence réprimée :



Dégradation des banques à 100 μM par l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* et la Msp à 30 ng/mL
Lecture au Berthold à $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$, lamp energy = 10000
 Δ Fluorescences obtenus à 180 min



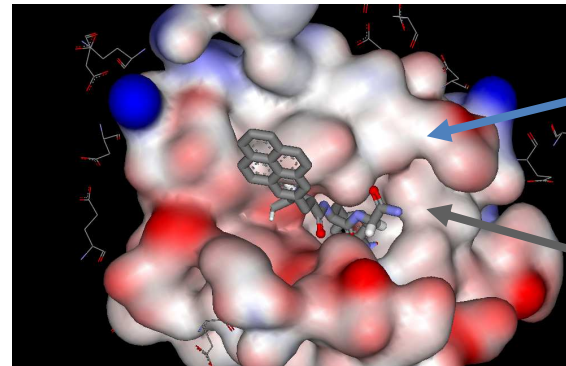
- Sur l'ensemble des banques, seul un peptide est exclusivement clivé par la Msp de manière extrêmement efficace.

Principaux résultats

- Optimisation du substrat Msp :

Modélisation

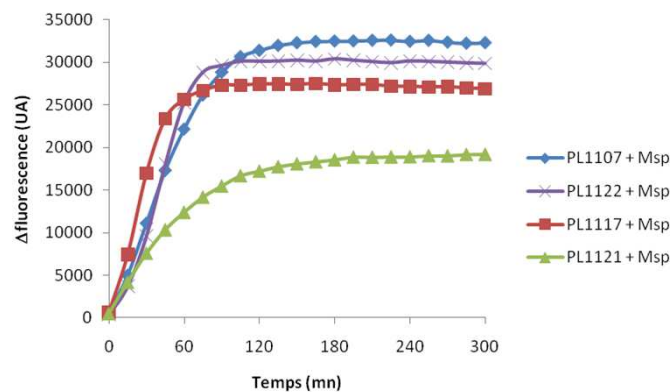
protection brevet
(21/07/2010)



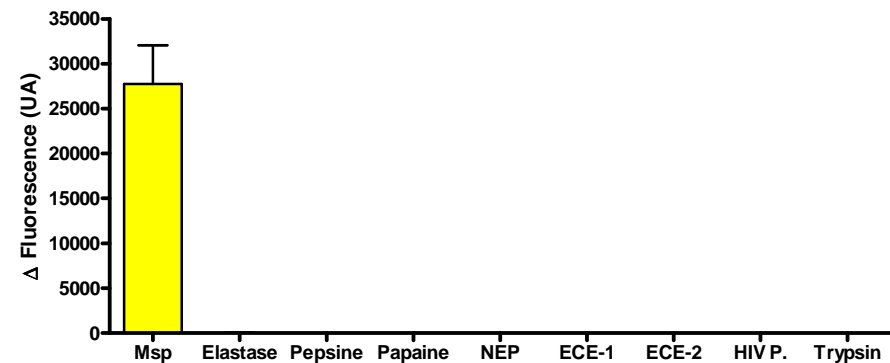
Msp

Substrat

Clivage du PL1107, PL1117, PL1121 et PL1122 à 10 μ M par la Msp M7 à 10 ng/mL
Lecture au Berthold à λ_{ex} = 340 nm, λ_{em} = 405 nm, lamp energy = 10000



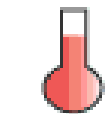
Clivage du PL 1107 par la Msp et d'autres protéases
[Enzyme] = 10 ng/mL, [PL 1107] = 10 μ M -
Incubation à 37°C (120min)
Lecture au Berthold (340-405 nm), lampe E = 10000



Principaux résultats

- Développement du test de détection :

0,8 ml d'échantillon
+ 0,2 ml tampon/substrat



120 min

37°C



$\Delta \text{ fluo } t_{120 \text{ min}} - t_0$

**Purification /
concentration de
l'échantillon**



Principaux résultats

- **Spécificité de la production de la Msp :**

Inclusivité :

- 15 sérogroupes *Legionella pneumophila* / 15
- 20 espèces *Legionella* / 20

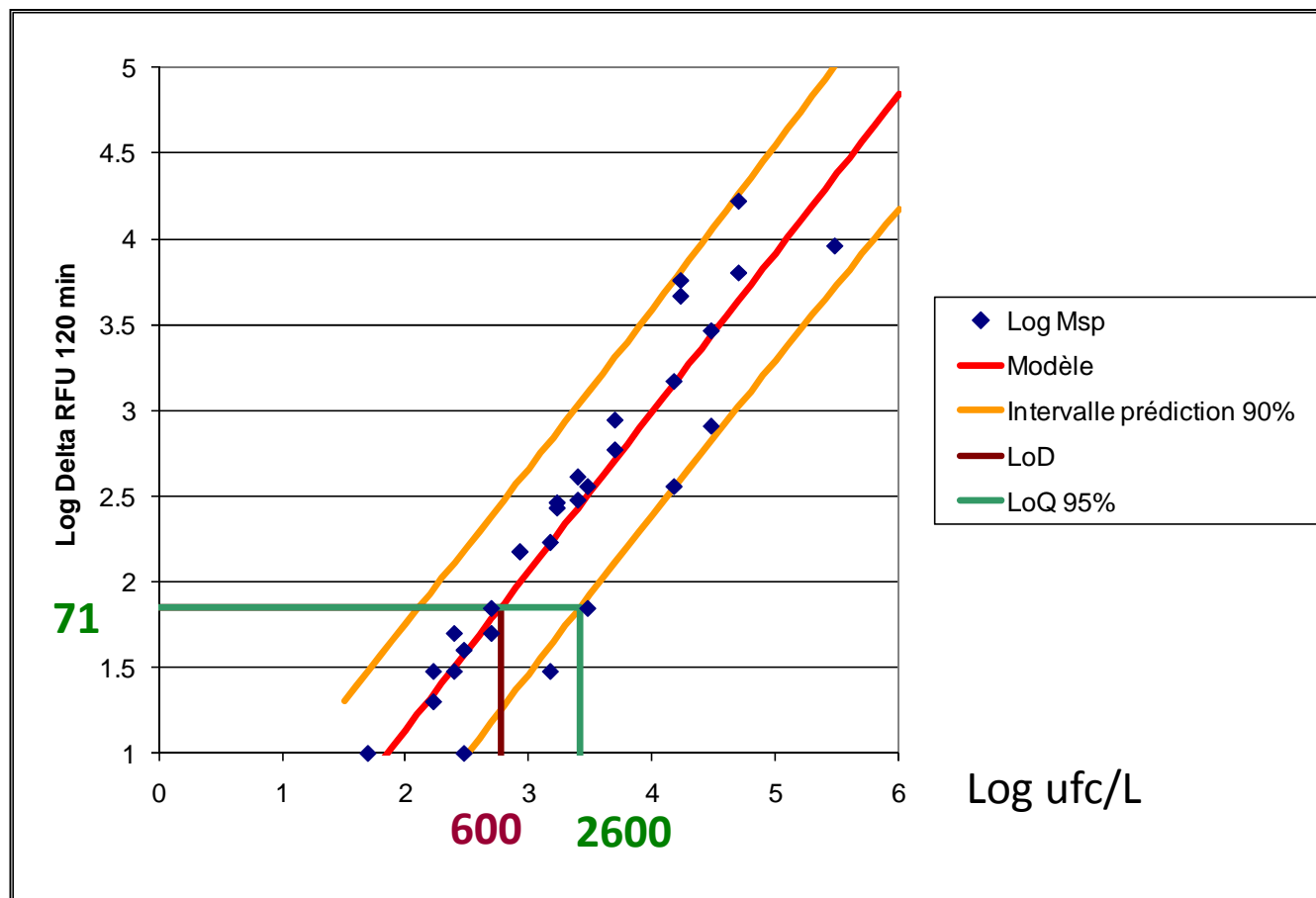
Exclusivité :

- 0 espèce ou genre non *Legionella* / 18

Species	Detection
<i>L. pneumophila</i> sg 1 to 15	+++
<i>L. anisa</i>	+++
<i>L. birminghamsis</i>	++
<i>L. bozemanii</i> 1-2	+++
<i>L. cherrii</i>	+++
<i>L. cincinnatiensis</i>	+++
<i>L. dumoffii</i>	+++
<i>L. erythra</i> 2	+++
<i>L. feeleii</i> 1-2	+
<i>L. gormanii</i>	++
<i>L. hackeliae</i>	+++
<i>L. jordanis</i>	+++
<i>L. lansingensis</i>	+++
<i>L. longbeachae</i> 1-2	+++
<i>L. maceachernii</i>	+
<i>L. micdadei</i>	+++
<i>L. oakridgensis</i>	+
<i>L. parisiensis</i>	++
<i>L. sainthelensi</i> 1-2	+++
<i>L. tucsonensis</i>	+++
<i>L. wadsworthii</i>	+++

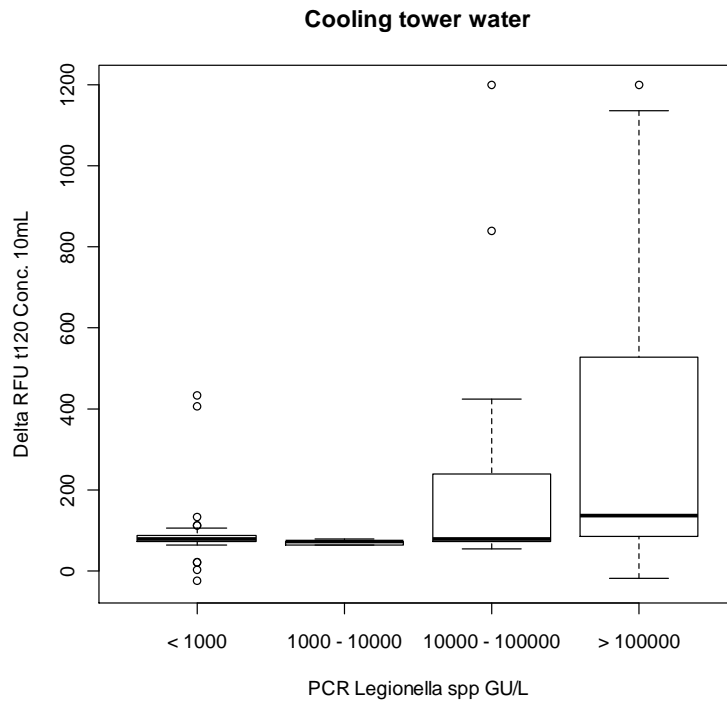
Principaux résultats

- Limites de détection & de quantification:



Principaux résultats

- Validation échantillons réels (eaux TAR) :



	Log	N
Seuil PCR	6,4	2,5E+06
Seuil Msp	2	100
Spécificité	82%	
Sensibilité	90%	
Seuil PCR	4,25	1,8E+04
Seuil Msp	1,85	71
Spécificité	75%	
Sensibilité	58%	
Seuil PCR	5,5	3,2E+05
Seuil Msp	1,9	79
Spécificité	75%	
Sensibilité	60%	

Bilan des principales avancées

- **La technologie des substrats à fluorescence réprimée** et le criblage des banques Fluofast ont permis d'identifier un substrat spécifique et sensible de la Msp (3 pg/ml)
- **La mesure de la Msp est spécifique aux espèces *Legionella*** (et non uniquement *L. pneumophila*)
- **Test fluorimétrique simple, rapide (2 heures) et qui pourra être réalisé sur site**
- **Validations sur échantillons de TAR :**
 - ☞ Corrélation entre Msp et quantification PCR *Legionella spp.*
 - ☞ Corrélation avec les mesures ATP
- **Validations sur échantillons d'ECS :** il ne semble pas possible différencier des faibles concentrations de legionelles (< 50 cfu/L) des contaminations plus fortes (> 10³ cfu/L).

Bilan de l'étude de faisabilité

vs cahier des charges initial :

- | | |
|--|--|
| ❖ Durée analyse ~2h | OK |
| ❖ Limite de Détection ~ 10 ³ CFU/L | OK (sur échantillons artificiellement contaminés) |
| ❖ Spécificité à <i>L.pneumophila</i> | <i>Legionella spp</i> |
| ❖ Analyse réalisable sur site | OK (si prototype) |
| ❖ Volume réactionnel = 2 ml | OK |
| ❖ Coût ~ 15 à 20 € (consommables) | OK (à confirmer) |
| ❖ Applications : Tours aéro-réfrigérantes
& Eaux chaudes sanitaires | Oui (à confirmer)
Non (à confirmer) |

Valorisation scientifique

- **Brevet** « Nouveaux substrats à fluorescence réprimée, leur préparation et leur utilisation pour l'identification, la détection et le dosage de *Legionella pneumophila* . Juillet 2010.
- **Communication orale** :
 - European Work Group on Legionella Infections (EWGLI), Vienne, Autriche, 25-27 Mai 2011
- **Publications** :
 - *Journal of Biological Chemistry* : «Design of a specific, high affinity fluorescently quenched substrate for the detection of the Major Secretory Protein of Legionella based on a three-dimensional model of its active site» Poras, H. et al, 2012, 287, 20221-20230
 - *En préparation* « Development of a fluorimetric assay based on Major Secretory Protein activity for rapid detection of *Legionella* in water samples»