

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
26 octobre 2012 (26.10.2012)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/143661 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/68 (2006.01) *C07D 221/12* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(74) Mandataires : **DOMANGE, Maxime** et al.; Cabinet
BEAU DE LOMENIE, 232 Avenue du Prado, F-13295
Marseille Cedex 08 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2012/050838

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :
17 avril 2012 (17.04.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1153336 18 avril 2011 (18.04.2011) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : **SO-
CIE TE DES EAUX DE MARSEILLE** [FR/FR]; 25 rue
Edouard Delanglade, F-13006 Marseille (FR). **CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
(CNRS)** [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR).

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **MEJEAN,
Vincent** [FR/FR]; 23 Boulevard du Vaisseau., n°55, F-
13009 Marseille (FR). **RAPTELET, Fanny** [FR/FR]; 45
rue de la Turbine, Eden Roc 2, F-13008 Marseille (FR).
DENIS, Yann [FR/FR]; 95 rue Challas, F-13007 Marseille
(FR). **LABED, Sid Ahmed** [DZ/FR]; 171 avenue de Lumi-
ny, Cité Universitaire de Luminy, F-13009 Marseille (FR).
LEGER, Gérard [FR/FR]; 22 traverse Marcel Maridet,
Les Terrasses de Bois Luz. Bât 3, F-13012 Marseille
(FR). **LIEUTAUD, Gérard** [FR/FR]; 118 avenue Joseph
Vidal, F-13008 Marseille (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec revendications modifiées (art. 19.1))
- avec la partie de la description réservée au listage des sé-
quences (règle 5.2.a))

(54) Title : METHOD FOR QUANTIFYING LIVING BACTERIA IN A LIQUID MEDIUM

(54) Titre : PROCÉDÉ DE QUANTIFICATION DE BACTÉRIES VIVANTES DANS UN MILIEU LIQUIDE

(57) Abstract : The present invention relates to a method for quantifying living bacteria in a liquid medium likely to contain same, characterised in that the following consecutive steps are performed: 1) yeast is added to said sample and mixing is carried out by agi-
tation; 2) an inhibitor compound is added, said inhibitor compound being capable of binding to the DNA of the dead bacteria, and
thus preventing the PCR amplification of said DNA; 3) the sample is heated to a temperature of no more than 100°C for 5 to 10 mi-
nutes, so as to lyse all the bacteria without causing the lysis of the yeast; 4) a fraction containing all the yeast and lysed bacterial de-
tritus is separated and a fraction containing the bacterial DNA is recovered; and 6) quantification is carried out by the PCR ampli-
fication, preferably by the real-time PCR, of the DNA from said bacteria that were initially living in the starting sample.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de quantification de bactéries vivantes dans un milieu liquide susceptible
d'en contenir caractérisé en ce qu'on réalise les étapes successives suivantes dans lesquelles : 1/ on ajoute des levures dans le dit
échantillon et on réalise un mélange sous agitation, et 2/ on ajoute un composé inhibiteur apte à se lier et empêcher ainsi l'amplifica-
tion par PCR de l'ADN des bactéries mortes, et 3/ on la chauffe l'échantillon à une température de pas plus de 100°C pendant 5 à 10
minutes, de manière à lyser toutes les bactéries sans provoquer la lyse des levures, et 4/ on sépare une fraction contenant toutes les
levures et débris de bactéries lysées et on récupère une fraction contenant l'ADN bactérien, et 5/ on met en œuvre une quantification
par amplification par PCR, de préférence par PCR en temps réel, de l'ADN provenant desdites bactéries initialement vivantes dans
l'échantillon de départ.

WO 2012/143661 A1

Procédé de quantification de bactéries vivantes dans un milieu liquide

La présente invention concerne un procédé de quantification de bactéries vivantes dans un milieu aqueux susceptible d'en contenir.

5 La présente invention concerne plus particulièrement une méthode de quantification de bactéries vivantes dans un échantillon aqueux susceptible de contenir un mélange de cellules mortes et vivantes.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé
10 de quantification de bactéries vivantes du genre entérocoques et Escherichia coli, contenues dans un échantillon d'eau de baignade et, plus particulièrement, d'eau de mer.

La méthode selon l'invention est utile car il existe des normes sanitaires réglementaires de concentration desdites bactéries E. coli et
15 entérocoques vivantes à ne pas dépasser dans lesdites eaux de baignades, à savoir, notamment, pas plus de 10 bactéries E. Coli/ml et 370 entérocoques/100 ml

On entend ici par bactéries E. coli, toutes les sous-espèces pathogènes et non pathogènes de l'espèce Escherichia coli.

20 Les méthodes de référence pour réaliser ces quantifications de bactéries E. coli et entérocoques dans les échantillons d'eau de baignade comprennent des cultures cellulaires desdites bactéries dans ledit échantillon et la quantification par mesure de l'activité enzymatique (Méthodes normalisées références NF T 90-432 (pour la
25 recherche des entérocoques) et NF T 90-433 (pour la recherche de E. Coli)). Dans cette méthode de référence, on ne réalise pas l'extraction desdites bactéries, ni la quantification d'ADN.

Les inconvénients de ce type de méthodes sont une durée et donc un délai de rendu des résultats important, à savoir requérant une

incubation de 48h environ), ainsi qu'une spécificité quant aux bactéries détectées insuffisantes et un manque de précision des résultats notamment pour les faibles valeurs.

On connaît également une méthode, dans laquelle on extrait les
5 bactéries de l'échantillon par filtration sur membranes, puis on extrait l'ARN desdites bactéries par lyse cellulaires et on quantifie l'ADN chromosomique par une méthode de RT PCR dans laquelle on transforme l'ARN en ADN.

L'avantage de cette méthode est que l'ARN des bactéries mortes
10 se dégrade de sorte que, lors de l'étape de quantification par amplification, on quantifie uniquement l'ADN des bactéries vivantes.

Toutefois, cette méthode présente les inconvénients suivants. La fragilité des ARN rend la technique très délicate et impose des conditions de manipulation drastiques, notamment des conditions
15 drastiques de décontamination des matériels et réactifs. D'autre part, la quantification est précédée d'une étape de transcription inverse pour transformer les ARN en ADNc. Cette étape peut introduire un biais dans la quantification, et montre qu'on ne quantifie pas directement la cible. En outre, la production d'enzyme RNase et donc la quantité d'ARN
20 dans une cellule bactérienne peut varier selon son état physiologique. Ainsi, en état de carence nutritionnelle comme dans les eaux de baignade, la bactérie produit des RNase qui vont dégrader ses ARN ribosomaux

Le but de la présente invention est de fournir une méthode
25 d'extraction et quantification de bactéries vivantes dans des eaux de baignade, soit à la fois, plus performante en termes de sensibilité d'extraction, de détection et de quantification, et simple et moins coûteuse à industrialiser.

Pour ce faire, la présente invention fournit un procédé de
30 quantification de bactéries vivantes dans un milieu liquide, de

préférence un milieu aqueux, susceptible d'en contenir, caractérisé en ce qu'on réalise les étapes successives suivantes dans lesquelles :

a/ on ajoute des levures dans le dit échantillon et on réalise un mélange sous agitation, et

5 b/ on sépare un résidu solide constitué d'un précipité contenant toutes les levures et bactéries contenues dans le dit échantillon,

 c/ on re-suspend le dit résidu solide dans une solution tamponnée à pH de 7 à 8, de préférence un tampon Tris 40mM à pH 7,6 et on y ajoute un composé intercalant photo-activable ou tout autre
10 composé chimique ou biologique apte, dans des conditions de concentration et/ou de traitement, à provoquer la liaison dudit composé spécifiquement à l'ADN des bactéries mortes sans provoquer la lyse ou dégradation des parois des bactéries vivantes ni la liaison à l'ADN des bactéries vivantes, ledit composé dénommé composé
15 inhibiteur étant apte à empêcher ainsi l'amplification par PCR de l'ADN qui lui est lié, et

 d/ on sépare une fraction contenant un résidu solide contenant toutes les levures et bactéries, et

 e) on chauffe ledit résidu solide, de préférence au bain marie, à
20 une température de pas plus de 100°C, de préférence à 95°C pendant 5 à 10 minutes, de manière à lyser toutes les bactéries sans provoquer la lyse des levures, et

 f/ on sépare une fraction contenant toutes les levures et débris de bactéries lysées et on récupère une fraction contenant l'ADN
25 bactérien, et

 g/ on met en œuvre une quantification par amplification par PCR, de préférence par PCR en temps réel, de l'ADN provenant desdites bactéries initialement vivantes dans l'échantillon de départ.

A l'étape a/, les levures ont semble-t-il un effet de "trapping" et/ou effet entraînant sur les bactéries. Cette étape a/ permet d'éviter d'avoir à mettre en œuvre à l'étape b) une étape de séparation des bactéries par filtration au cours de laquelle il y a nécessairement des
5 pertes lors du décrochage des bactéries sur les filtres d'une part, et d'autre part permet d'éviter de mettre en œuvre des agents précipitants chimiques actuellement dans le commerce, lesquels sont relativement plus onéreux.

A l'étape c), ledit composé inhibiteur est mis en œuvre dans les
10 conditions de concentration et de traitement aptes à provoquer ladite liaison dudit composé à l'ADN des bactéries mortes.

Un premier aspect de l'invention est donc d'avoir découvert cet effet technique des levures, à savoir cette utilisation nouvelle des levures à titre d'agent précipitant dans l'extraction de bactéries, à
15 savoir que :

- à l'étape a/, les levures entraînent ou retiennent la totalité des bactéries mortes et vivantes de l'échantillon liquide testé, et

- à l'étape d/, on élimine ainsi ledit composé inhibiteur et d'autres molécules éventuelles présentes dans l'échantillon initial
20 pouvant affecter les étapes ultérieures, et

- à l'étape e/, les levures résistent jusqu'à 15 minutes à une température de 95 à 100°C, de sorte que, en pratique, pour réaliser le claquage des parois bactériennes des bactéries mortes et des bactéries vivantes, un chauffage de 5 mn est suffisant, sans affecter la paroi des
25 levures.

L'étape e/ permet donc de récupérer ultérieurement (à l'étape f/) l'ADN bactérien à savoir l'ADN provenant des bactéries mortes liées au composé inhibiteur et l'ADN non lié au composé inhibiteur provenant des bactéries initialement vivantes, et non pas l'ADN des levures, ce
30 qui serait dommageable à la sensibilité de la PCR de l'étape g/, compte

tenu de la relativement grande quantité de levures mises en œuvre initialement.

Cette étape e/ permet d'éviter la mise en œuvre d'une lyse chimique suivie d'une purification sur colonne pour réduire les coûts.

- 5 Le chauffage présente aussi l'intérêt d'éviter la mise en œuvre de détergent onéreux et de colonne spécifique de purification, étant entendu en outre que lesdits détergents peuvent avoir un effet inhibiteur sur le rendement de la PCR ultérieur.

- 10 Les essais réalisés démontrent qu'à l'étape d/, on récupère au moins 99% des bactéries initialement contenues dans l'échantillon.

- 15 L'intérêt de l'invention résulte essentiellement du double effet technique avantageux de la mise en œuvre de levures en tant qu'agent précipitant favorisant donc l'extraction des bactéries sans gêner l'extraction sélective de l'ADN bactérien dans le cas d'une étape d'extraction d'ADN par chauffage, l'ADN des levures n'étant pas récupéré d'une part, et d'autre part, l'ADN bactérien n'étant pas dégradé.

- 20 C'est la combinaison de la mise en œuvre de levures à titre d'agent précipitant de bactéries d'une part, et un procédé d'extraction d'ADN simple et peu onéreux par mise en température à 95-100°C d'une solution du culot bactérien et de levures, qui sont à l'origine des résultats avantageux de l'invention.

- 25 A l'étape f/, l'ADN bactérien comprend l'ADN non dégradé des bactéries initialement vivantes et l'ADN lié au dit composé inhibiteur provenant de la lyse des bactéries initialement mortes.

- 30 Le procédé selon l'invention consiste donc essentiellement, dans un premier temps, à récupérer la totalité des cellules présentes dans l'échantillon aqueux, puis d'éliminer l'ADN des cellules mortes, avant d'extraire et de purifier l'ADN des bactéries vivantes. Finalement, l'ADN obtenu est suffisamment pur pour être quantifié par PCR en temps réel.

Le procédé selon la présente invention peut être mis en œuvre en moins de 4 heures et s'avère plus précis que la méthode de référence comparative.

Plus particulièrement, à l'étape g/, on réalise la quantification
5 des bactéries vivantes du genre entérocoques et Escherichia Coli contenues dans un échantillon d'eau de baignade.

Selon une autre caractéristique particulière avantageuse, à l'étape b/, on réalise la centrifugation de l'échantillon à au moins 5 000 g dans un récipient pendant au moins 10 minutes et on récupère le
10 culot par élimination du surnageant.

Cette vitesse minimale de 5 000 g permet d'obtenir un rendement de récupération cellulaire de plus de 99%. Aux vitesses inférieures à 5 000 g, il faut augmenter considérablement le temps de centrifugation pour obtenir un rendement de récupération cellulaire de plus de 99%.
15 Des vitesses de centrifugations supérieures à 5 000 g conviennent mais ne permettent pas de diminuer les temps de centrifugation.

Plus particulièrement encore, à l'étape a), on utilise de la levure boulangère de *Saccharomyces cerevisiae*, la concentration en levures étant ajustée à une valeur de 200 à 400 µg/ml, de préférence environ
20 300 µg/ml.

A cette concentration de 200 µg/ml, les levures forment un tamis cellulaire qui entraîne dans sa précipitation toutes les cellules bactériennes, de préférence sous l'action de la force centrifuge lorsque la séparation est effectuée par centrifugation. Aux concentrations
25 supérieures à 400 µg/ml, le culot devient trop important et ne reste pas fixé au fond du récipient.

Avantageusement encore, à l'étape a/, on ajoute en outre dans l'échantillon une protéine coagulante telle que le sérum albumine bovine (BSA) à une concentration de 2 à 20 mg/ml dans l'échantillon

pour favoriser l'adhérence du culot sur la paroi du récipient de centrifugation à l'étape b/.

A des concentrations trop élevées de protéines coagulantes, il devient difficile de réhydrater et re-suspendre le résidu solide à l'étape c/, d'une part, et, d'autre part, l'efficacité de l'étape e/ de chauffage peut se trouver affectée du fait de la coagulation de ladite protéine.

Dans un mode préféré de réalisation, à l'étape c/, ledit composé inhibiteur est un agent intercalant photo-activable et on soumet la suspension à un traitement d'irradiation lumineuse d'activation de la liaison dudit agent intercalant avec l'ADN des bactéries mortes, ledit agent intercalant inhibant l'amplification par PCR dudit ADN auquel il est lié.

Il est connu de l'homme du métier, notamment dans WO 01/77379 et WO 2007/100762, que certains agents photoactivables intercalant peuvent se lier spécifiquement avec l'ADN des bactéries mortes, dont la paroi membranaire est dégradée ou lysée, puis se lier par intercalation avec l'ADN des bactéries mortes, sans pouvoir pénétrer à l'intérieur des bactéries vivantes et, donc, sans se lier à l'ADN des bactéries vivantes. Les bactéries mortes ont leur paroi fragilisée, rendue perméable, voire déchirée, ce qui permet à un agent intercalant de traverser la paroi et de pénétrer dans la cellule pour atteindre son ADN car les bactéries sont des organismes ne possédant pas de noyau et leur ADN n'est donc pas protégé par une membrane à l'intérieur de la bactérie.

Cette intercalation inhibe l'amplification par PCR de l'ADN. L'ADN des cellules mortes ainsi que les brins d'Adn libres liés à l'agent intercalant dans l'échantillon ne sont alors plus quantifiable en PCR ce qui rend la méthode spécifique des cellules vivantes car l'agent intercalant reste bloqué au niveau de la paroi des bactéries vivantes, et permet donc à l'étape g/ de quantifier spécifiquement uniquement

l'ADN des bactéries vivantes par amplification par PCR, puisque l'agent intercalant photoactivable ne lui est pas lié.

Plus particulièrement, selon la présente invention, ledit agent intercalant est un azoture d'éthidium, de préférence l'EMA, à une
5 concentration de 2 à 5 µg/ml et on soumet la suspension à une irradiation lumineuse, en maintenant une température de suspension à la température ambiante, de préférence en trempant le récipient la contenant dans la glace. En présence de lumière et grâce à sa fonction chimique particulière notamment l'azoture s'agissant de l'EMA, l'agent
10 intercalant peut se coupler à l'ADN de façon covalente.

Plus particulièrement, on réalise une irradiation lumineuse en plaçant la suspension sous une lampe halogène de 150 Watt à 20 cm pendant au moins 10 minutes.

Le composé EMA est tout particulièrement intéressant, du fait de
15 son faible coût et de ce que l'utilisation de l'EMA contrairement au PMA nécessite des concentrations très faibles pour le traitement de l'ADN des bactéries mortes (2 à 5 µg/ml pour l'EMA au lieu de 100 µg/ml pour le PMA) le risque pour l'utilisateur est donc beaucoup moins important du fait du caractère cancérigène de ces molécules
20 mutagènes.

Selon une autre caractéristique avantageuse, à l'étape d/, on réalise la dite séparation par centrifugation de la suspension obtenue après le traitement de l'étape c/, à au moins 5 000 g pendant au moins 10 minutes et élimination de la plus grande part du surnageant pour
25 récupérer le culot contenant ledit résidu solide contenant toutes les levures et bactéries dans une petite fraction d'au moins 500 µl de la dite suspension, et on la chauffe à l'étape e).

Là encore, aux vitesses inférieures à 5 000 g, il faut augmenter considérablement le temps de centrifugation pour obtenir un
30 rendement de récupération cellulaire de plus de 99%. Des vitesses de

centrifugations supérieures conviennent mais ne permettent pas de diminuer les temps de centrifugation.

Plus particulièrement encore, à l'étape f/, on réalise la dite séparation par centrifugation de la suspension obtenu après le traitement de l'étape c/, à au moins 5000 g pendant au moins 5 minutes et élimination du culot contenant les levures intactes et les débris de bactéries lysées, pour récupérer le surnageant contenant ledit ADN bactérien.

Là encore, aux vitesses inférieures à 5 000 g, il faut augmenter considérablement le temps de centrifugation pour culoter l'ensemble des levures et débris cellulaires, des vitesses de centrifugation supérieures conviennent.

Plus particulièrement encore, à l'étape g/ on réalise une étape préalable purification de l'ADN bactérien, de préférence sur colonne de silice ou une colonne de filtration membranaire de seuil de 30 KDa.

Le seuil de 30 KDa est choisi parce que les chromosomes bactériens ont au minimum 3.10^6 bases. De façon connue, ces colonnes de filtration présentent une membrane hydrophile qui va retenir l'ADN bactérien, sans le fixer. Toutes les autres molécules et sels résiduels seront éliminés dans le filtrat. L'ADN retenu dans un faible volume de TE sera récupéré en retournant la colonne au dessus d'un tube propre.

Cette étape de purification permet d'éliminer des protéines et des ARNs relargués par les bactéries ou encore des traces résiduelles de composé inhibiteur tel que l'EMA ou d'autres molécules éventuellement présentes dans l'échantillon initial, ceci afin que la quantification ultérieure par PCR soit la plus fiable possible en éliminant toutes impuretés de l'échantillon pouvant affecter la fiabilité et spécificité de l'amplification par PCR notamment pouvant affecter l'action d'une enzyme polymérase entre autres.

Plus particulièrement encore, à l'étape g/ on amplifie les bactéries E. Coli et entérocoques avec les couple d'amorces suivantes :

- pour les bactéries E. coli : une séquence spécifique de E. coli
5 tirée du gène 16S, et

- pour les bactéries du genre entérocoques : une séquence spécifique du genre Enterococcus tirées du gène tuf.

Les 2 séquences spécifiques ci-dessus ont été choisies car elles permettent de réaliser des cycles d'amplification et une quantification
10 dans les mêmes conditions et selon un même protocole pour les 2 séquences.

On peut réaliser une PCR classique avec le Sybr Green comme fluorochrome, l'amplification pouvant être réalisé simultanément sur une même plaque car les protocoles de PCR sont identiques, la
15 quantification de chaque espèce nécessitant toutefois des puits séparés pour chaque analyse.

Avantageusement encore, pour la quantification, on réalise l'amplification d'une gamme d'étalons d'ADN chromosomiques desdites bactéries vivantes et/ ou une gamme d'étalonnage d'ADN synthétique
20 non bactérien dénommé ADN alien à différentes concentrations connues. Dans ce dernier cas à l'étape g/ on ajoute dans l'échantillon d'Adn à quantifier, une concentration connue de dite ADN alien à titre de contrôle interne.

on utilise les oligonucléotides suivants choisis parmi :

25 - SEQ. ID. n°1 et 2 pour les amorces 5' et 3' pour l'amplification de la séquence tirée du gène 16S de la bactérie E. Coli, et

- SEQ. ID. n°3 et 4 pour les amorces 5' et 3' pour l'amplification de la séquence tirée du gène tuf des bactéries entérocoques, et

- SEQ. ID. N°5 pour la séquence de contrôle interne d'ADN alien,
et

- SEQ. ID. n°6 et 7 pour les amorces 5' et 3' de la séquence SEQ.
ID. n°5.

5 Les séquences d'ADN SEQ. ID. n°1 à 7 sont décrites dans le
listage de séquence annexé à la description.

Les étapes d'extraction et de quantification du procédé selon
l'invention sont suffisamment sensibles pour permettre de détecter des
concentrations de 2 à 10^8 bactéries vivantes/ml d'échantillons.

10 Le seuil maximum de 10^8 bactéries est lié à un problème de
sensibilité de la PCR alors que le seuil minimal de 2 bactéries/ml est lié
à la fois aux performances d'extraction et de sensibilité de la PCR.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention
apparaîtront à la lumière des exemples détaillés de réalisation ci-
15 après.

L'exemple 2 se réfère aux figures 1 à 3 suivantes dans
lesquelles :

- la figure 1 représente les effets de la concentration en azoture
d'éthidium sur des échantillons constitués uniquement de bactéries
20 vivantes ou uniquement de bactéries mortes ou encore sur des
échantillons mixtes contenant des bactéries vivantes et des bactéries
mortes, avec une durée d'illumination de 20 mn, les 3 concentrations
en EMA suivantes ayant été testées : 3 µg/ml, 6 µg/ml et 12 µg/ml.

Dans la figure 1, les symboles suivants ont les significations
25 suivantes :

 : échantillon avec bactéries vivantes uniquement

 : échantillon avec bactéries mortes uniquement

: échantillon avec bactéries vivantes et mortes



- la figure 2 représente les effets du traitement de l'azoture d'éthidium à 3 µg/ml avec des durées d'élimination variables (10 mn et 20 mn) sur des échantillons constitués de bactéries vivantes, ou des échantillons constitués de bactéries mortes ou des échantillons mixtes contenant des bactéries mortes et des bactéries vivantes.

Dans la figure 2, les symboles suivants ont les significations suivantes :



: échantillon avec bactéries vivantes uniquement

10



: échantillon avec bactéries mortes uniquement



: échantillon avec bactéries vivantes et mortes

0 : sans EMA

- la figure 3 représente le rendement (%) de l'étape d'extraction d'ADN par chauffage en fonction de la durée (t) d'incubation à 95°C (de 0 à 15 minutes).

Exemple 1 : Quantification de E. coli et Enterococcus présents dans un échantillon de milieu aqueux

On a réalisé les cinq étapes successives suivantes de :

1/- récupération et concentration de l'ensemble des cellules par centrifugation avec utilisation d'un précipitant spécifique et novateur (cette étape 1 correspond aux étapes a/ et b/) définies ci-dessus);

2/- déstructuration de l'ADN des bactéries mortes et de l'ADN libre dans l'échantillon par un traitement à l'EMA (cette étape 2 correspond à l'étape c/ définie ci-dessus);

3/-récupération et lyse totale des cellules par un chauffage de l'échantillon et séparation de l'ADN du reste de l'échantillon (cette étape 3 correspond aux étapes d/ à f/ définies ci-dessus);

4/-purification de l'ADN sur colonne de silice ou par filtration sur membrane (cette étape est incluse dans l'étape f/ définie ci-dessus);

5/- quantification de l'ADN par PCR quantitative (cette étape est incluse dans l'étape g/ définie ci-dessus).

5 1/- Etape de récupération de l'ensemble des bactéries

La centrifugation permet de concentrer l'échantillon et de séparer les culots cellulaires des surnageants. La difficulté majeure avec la centrifugation réside dans le fait qu'à des concentrations cellulaires inférieures à 10^7 bactéries par ml, même avec des vitesses allant jusqu'à 17 000 x g pendant des durées relativement longues (20 mn), le rendement de récupération cellulaire est rarement supérieur à 60% et, même pour des échantillons dont la concentration bactérienne est supérieure à 10^7 /ml une centrifugation de 15 mn à 17.000 x g/ ne permet de récupérer que 95% des bactéries dans le culot.

15 C'est pourquoi selon la présente invention, on ajoute un précipitant jusque-là encore jamais utilisé pour cet usage : *Saccharomyces cerevisiae* dite levure de boulangerie. Les levures sont des microorganismes, champignons unicellulaires de 5 à 6 μ m, capables de sporuler et donc faciles à conserver. Très résistantes, leurs parois leur permettent de survivre à la déshydratation et aux températures élevées. Ainsi, la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*, commercialisée sous forme déshydratée, s'est révélée être un excellent candidat pour assurer la sédimentation des bactéries. En effet, il s'agit d'un organisme unicellulaire qui sédimente rapidement. Une centrifugation de 10 min à 5 000 x g suffit pour former un culot de levure stable au fond du tube et assure la récupération des cellules bactériennes. Des quantifications réalisées sur gel d'agar avant et après cette centrifugation ont montré que quelque soit la quantité initiale de bactéries, l'ajout de levures déshydratées (préalablement resuspendues dans une solution de Tris stérile) dans l'échantillon assure une récupération de 100 % des bactéries. De plus, en ajoutant de la BSA en solution dans un échantillon, on peut observer un culot

encore plus solide. D'autre part, l'utilisation de cette solution de BSA est un atout pour les premiers rinçages car elle est réputée pour capter les sels présents dans un échantillon et faciliter la PCR ultérieure même en présence d'inhibiteurs (King C.E., Debruyne R., Kuch M.,
5 Schwarz C., and Poinar H.N. (2009): A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts. BioTechniques, Vol. 47, p. 941-949).

Plus précisément, 200 mg de levure déshydratée sont transférés dans un tube de 2 ml, puis on ajuste le volume à 2 ml avec une
10 solution tampon Tris (40 mM et pH 7,6) puis on mélange sous agitation avec un dispositif Vortex pendant 2 minutes. On obtient ainsi une suspension de levure avec une concentration de 100 mg/ml. Parallèlement, on prépare une solution de BSA de 60 mg/ml dans de l'eau stérile. Ensuite, on transfère 50 mL d'échantillon d'eau de mer à
15 tester dans un flacon de 50 ml. Puis on y ajoute 150 µl de suspension de levure ci-dessus et 2 ml de solution de BSA ci-dessus et on homogénéise.

La suspension de levure ainsi ajoutée à la concentration de 300 µg/ml dans l'échantillon forme un tamis cellulaire et, au cours d'une
20 centrifugation à la vitesse minimale de 5 000 x g pendant 10 minutes, entraîne l'ensemble des bactéries présentes dans le culot. D'autre part, la BSA à la concentration de 3 mg/ml dans l'échantillon permet de rendre ce culot solide et d'éviter son écoulement lors de l'élimination du surnageant. La suspension de levure peut être préparée soit à partir
25 de levures fraîches soit à partir de levures déshydratées resuspendues dans du tampon Tris 40mM pH 7,6 afin d'éviter un choc osmotique. La BSA est réhydratée dans de l'eau stérile. D'autre part, les levures n'inhibent pas la PCR quantitative ultérieure. En effet, si l'on poursuit le protocole jusqu'à l'extraction de l'ADN, et qu'on quantifie cet ADN
30 par PCR quantitative en temps réel, on obtient un rendement (Quantité ADN mesurée / Quantité initiale de bactéries) proche de 1.

2/- Traitement à l'azoture d'éthidium

Le surnageant éliminé après la première centrifugation de 10 minutes à 5 000 g à la température de 25°C, il reste dans le culot les levures et toutes les bactéries vivantes et mortes initialement présentes dans l'échantillon. Ce culot est repris dans 15 ml d'un
5 tampon Tris 40 mM pH 7,6 et 45 µl d'une solution d'azoture d'éthidium (EMA) dans du TMAO (triméthyl amine oxyde) sont ajoutés, l'EMA se trouvant ainsi ajouté à la concentration de 3 µg/ml dans l'échantillon. Une première courte incubation de 30 secondes à 5 minutes, à température ambiante et à l'obscurité, permet à l'EMA de traverser les
10 parois perforées des cellules mortes. Puis une phase de photoactivation permet de lier l'éthidium de façon covalente à l'ADN. Ces liaisons entraînent des modifications structurales de l'ADN qui ne pourra alors plus être quantifié par PCR quantitative (pas de déshybridation, pas de fixation de la polymérase). Cette photoactivation est réalisée en
15 plaçant les échantillons dans un bac à glace afin d'éviter son échauffement. Placé sur une table d'agitation, l'échantillon est homogénéisé tout au long de son illumination. Pour la photo activation, une lampe halogène de 150 Watt est positionnée 20 cm au dessus de la surface de l'échantillon. L'illumination dure ainsi 10 minutes. Dans ces
20 conditions, l'ADN des bactéries vivantes, protégé par la paroi imperméable, conserve sa structure et ses propriétés. L'EMA une fois activé par la lumière ne pourra plus agir ultérieurement. On peut alors compléter le volume de l'échantillon à 50 ml avec le tampon Tris et centrifuger de nouveau l'échantillon dans les mêmes conditions que
25 précédemment, à savoir 10 minutes à 5 000g et à la température de 25°C.

3/- Etape de lyse des cellules par chauffage et récupération de l'ADN de l'échantillon

La centrifugation ci-dessus permet de reformer un culot constitué
30 des levures et des cellules vivantes et mortes. Le surnageant peut être éliminé grossièrement de façon à ne laisser qu'une fraction de 500 µL environ contenant le résidu solide. Pour cela il suffit simplement de

retourner et de vider le tube. Un court vortexage permet de resuspendre le culot dans le surnageant résiduel. Sous l'action d'un choc thermique (5 minutes à 95 °C puis 5 minutes dans la glace), les cellules lysent et libèrent leur ADN. Une rapide centrifugation de 5
5 minutes à 25°C et à 5 000 x g suffit alors pour séparer le culot de levure et les débris cellulaires du surnageant dans lequel est dissout l'ADN.

4/- Etape de purification de l'ADN

Le surnageant contient donc l'ADN à quantifier. Cependant, il est
10 susceptible d'être contaminé par des protéines et des ARNs relargués par les bactéries ou encore des traces résiduelles d'EMA ou autres molécules éventuellement présentes dans l'échantillon initial. La quantification par PCR quantitative exige une certaine pureté de l'échantillon. En effet, basée sur l'action d'une polymérase, l'efficacité
15 de la technique peut être diminuée en présence d'inhibiteurs. Le surnageant est donc purifié et concentré soit :

a) par filtration sur membrane. Tout le surnageant est prélevé et déposé sur une colonne Vivacon 500 (Sartorius stedim, membrane hydrosart) avec un seuil de rétention de 30 000 Da préalablement
20 rincée avec du TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8). L'échantillon est alors rincé deux fois avec le TE. Les filtrations sont permises grâce à des centrifugations successives à 7 000 x g pendant 10 minutes. Les rinçages effectués, toutes les molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 30 kDa ont été éliminées et l'ADN peut donc être récupéré
25 dans le volume de TE retenu au dessus de la membrane en retournant la colonne au dessus d'un tube propre.

b) par fixation-élution sur colonne de silice. Tout le surnageant est mélangé avec des solutions de rinçage puis passé sur une colonne QIAamp MinElute (Kit QIA amp DNA Micro, QIAGEN).
30 L'ADN contenu dans l'échantillon va se fixer sur les billes de silice contenu dans la colonne. Après un rinçage, l'ADN est élué dans 50 µL

de TE. Le passage des solutions sur la colonne est effectué grâce à des centrifugations de 1 à 3 minutes à 20 000 x g.

L'ADN obtenu est alors suffisamment pur pour être quantifié par PCR quantitative.

5 5/- Etape de quantification par PCR quantitative

On a utilisé un appareil MX 3500 P de la société STRATAGENE et le kit WIZARD GENOMIC PURIFICATION de la société PROMEGA pour extraire l'ADN en ajoutant une étape de digestion de protéine avec la protéinase K.

10 Un contrôle interne préférable pour vérifier l'absence d'inhibition de la PCR dans chaque échantillon. Ce contrôle est réalisé en ajoutant une quantité connue d'ADN synthétique, ci-après SEQ. ID. n°5 vu absent de toutes banques chromosomiques, dans l'échantillon final. La quantité de cet ADN est mesurée par PCR quantitative avec les amorces
15 SED. ID. n°6 et 7 ce qui permet de déterminer s'il existe une inhibition, et si tel est le cas de calculer la dérive qu'elle entraîne. En supposant que l'inhibition influence autant l'amplification de l'ADN synthétique que celle de l'ADN bactérien, on déduit la quantité réelle d'ADN bactérien dans l'échantillon.

20 Une gamme étalon est nécessaire pour chaque gène ciblé par la PCR quantitative. En effet, l'appareil de PCR quantitative détermine le cycle seuil (« cycle threshold » dit ct), cycle à partir duquel la fluorescence est suffisamment importante pour être mesurée. Plus la concentration initiale en ADN cible est importante plus la fluorescence
25 sera quantifiable tôt. Pour traduire ce cycle seuil en quantité d'ADN, une gamme étalon de 5 points minimum est donc nécessaire. Cette gamme est effectuée avec de l'ADN génomique extrait de la bactérie ciblée, purifié et quantifié en nombre de copies par microlitre ou avec la séquence cible synthétique quantifiée en nombre de copies par
30 microlitre.

Les séquences d'ADN synthétique ainsi que les oligonucléotides permettant l'amplification de ce dernier ont été construits spécifiquement pour cette technique. Les oligonucléotides ciblant des gènes spécifiques des *Escherichia coli* et des entérocoques ont été
5 récupérés de la littérature. La sensibilité de la PCR quantitative dépend de la spécificité des amorces utilisées. Trois couples d'amorces ont été testés pour *E. coli* :

- un couple d'amorces ciblant une séquence du gène uidA, spécifique de *E. coli* et codant pour la β -glucuronidase (protéine dosée
10 par la méthode enzymatique).

- un couple ciblant le gène 16S qui est également spécifique de *E. coli*, et qui, étant présent en plusieurs copies dans le génome (5 à 7 copies) permet une détection plus sensible, et donc un seuil plus bas.

- un couple ciblant le gène LacZ, mais ces amorces non
15 spécifiques de *E. coli* ont été éliminées.

Les amorces du gène 16S ont été privilégiées pour l'étude car, pour des échantillons à faible concentration chromosomique, les amorces du gène uidA faisaient apparaître des concatémères d'oligonucléotides empêchant la mesure exacte du nombre de copies du
20 gène. Des concentrations différentes (homo-concentrations et hétéro-concentrations) en amorces dans le volume réactionnel ont été testées, des modifications de la durée et/ou de la température lors de la phase d'élongation ont également fait l'objet d'une étude, mais aucune des conditions testées n'a permis d'éliminer la formation de ces dimères
25 et/ou concatémères.

Deux couples d'amorces ont été testés pour Entérocoques.

- Des amorces ciblant gène 23S, spécifique des entérocoques,

- Un couple ciblant une séquence du gène codant pour la protéine Tuf tout autant spécifique des Entérocoques.

Ce second couple a été privilégié pour la quantification des entérocoques car l'amplification et la quantification de la séquence ciblée peuvent être réalisées avec le même protocole de PCR quantitative que celui de la quantification des E. coli.

- 5 Le couple d'oligonucléotides utilisé pour quantifier le nombre de chromosomes des E. coli proposé par Malinen et al (2003) (Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 59-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. Microbiology, Vol. 149, p. 10 269–277) ciblant le gène 16S des E. coli uniquement, présente les séquences suivantes :

Ecoli16s Fw : SEQ. ID. n° 1 = 5' - GTTAATACCTTTGCTCATTGA -
3

Ecoli16s Rv : SEQ. ID. n° 2 = 5' - ACCAGGGTATCTAATCCTGTT -
15 3'

- Le couple d'amorces utilisé pour quantifier le nombre de chromosomes des entérocoques établi par Morrison et al (2008) : (Quantification of enterococci and bifidobacteria in Georgia estuaries using conventional and molecular methods. Water Research, Vol 42, p. 20 4001-4009) ciblant le gène de la protéine Tuf des entérocoques, présente les séquences suivantes :

EnteroTuf Fw : SEQ. ID. n° 3 = 5' - TACTGACAAACCATTCATGATG
- 3'

EnteroTuf Rv : SEQ. ID. n° 4 = 5' - AACTTCGTCACCAACGCGAAC -
25 3'.

Chaque analyse est indépendante et a été optimisée avec des Kit de SYBR Green mais l'amplification et la quantification des séquences cibles d'E. coli et des entérocoques peuvent être réalisées simultanément au cours d'un même programme PCR. Avec les couples

d'amorce utilisées à la concentration de 0,4 µM, chaque cycle d'amplification contient seulement deux étapes : une étape de déshybridation à 95°C pendant 5 secondes suivie d'une étape de fixation de la TaqPolymérase et de polymérisation à 60 °C pendant 25 secondes. Le niveau de fluorescence dans chaque puits est mesuré à la fin de chaque cycle. Une courbe de fusion de l'ADN amplifié est réalisée à la fin des cycles d'amplification, elle permet de vérifier l'amplification d'une séquence unique et spécifique. L'appareil de PCR quantitative estime alors le nombre de copies initial de séquence cible dans la prise d'essai de chaque échantillon. En tenant compte du volume final de l'échantillon et de la dérive due à l'inhibition, la concentration initiale en bactéries dans l'échantillon peut être déterminée.

La séquence de contrôle interne d'ADN synthétique dite séquence alien et ses amorces d'amplification étaient les séquences suivantes :

Séquence alien =

SEQ. ID. N° 5 = 5' –

CCCATTTCATCTGCCAGCTAGCAGACGGGCACAACGGGTCAACATATTGCTGCTT
GGACTTAAGTTACGCTAGAGGTTTCTATGGGCCAGGTGCATAAGGATGCTCTC

CCA – 3'

Ali Fw : SEQ. ID. n° 6 = 5'- GGGTAAGTAGACGGTCGATC – 3'

Ali Rv : SEQ. ID. n° 7 = 5' – ACGTATTCCTACGAGAGGGT – 3'

Exemple 2 : Influence de la concentration en EMA et du traitement d'illumination.

2.1/- Influence de la concentration en EMA sur la liaison à l'ADN des cellules vivantes et mortes.

Des essais de quantification d'ADN sur des échantillons préalablement traités avec des concentrations variables en azoture d'éthidium de 3, 6 et 12 µg/ml ont été réalisés. Trois types

d'échantillons ont été testés, des échantillons composés uniquement de bactéries vivantes ou mortes (non lysées) et des échantillons mixtes contenant 10 fois plus de cellules mortes non lysées que cellules vivantes dans 50 ml d'eau de mer filtrée. La figure 1 présente les
5 détails et résultats de l'expérience.

Le rendement en ordonnée (%) correspond au rapport du nombre de chromosomes mesuré par rapport à la quantité initiale en bactéries dans l'échantillon.

Suite à une exposition de 20 minutes sous une lampe halogène
10 (150 W), seule la concentration de 3 µg/ml d'EMA d'échantillon semble adaptée. En effet, après un traitement à l'azoture d'éthidium aux concentrations 6 µg/ml et 12 µg/ml, aucun chromosome n'est quantifié dans les échantillons contenant des bactéries vivantes uniquement. En revanche, après un traitement à l'azoture d'éthidium à la concentration
15 de 3 µg/ml, dans un échantillon mixte, la PCR quantitative permet de quantifier 96% des chromosomes des bactéries vivantes. L'EMA semble donc agir prioritairement sur les cellules mortes. D'autre part, cette concentration apparaît suffisante pour traiter tout l'ADN des cellules
20 mortes, après un tel traitement, la PCR quantitative ne quantifie rien. Cependant, le traitement s'avère être trop puissant car dans un échantillon constitué de cellules vivantes uniquement, la PCR quantitative ne quantifie que 53 % des chromosomes. Dans ces conditions, l'EMA déstructure une partie de l'ADN des cellules vivantes
25 en absence de cellule morte.

2.2/- Influence du traitement d'illumination sur la liaison à l'ADN des cellules

Des essais de quantification d'ADN sur des échantillons traités à l'azoture d'éthidium 3 µg/ml pendant des durées d'illumination
30 variables (10 et 20 minutes) ont été réalisés. Trois types d'échantillons sont testés, des échantillons composés uniquement de bactéries

vivantes ou mortes (non lysées) et des échantillons mixtes contenant 10 fois plus de cellules mortes non lysées que cellules vivantes dans 50 ml d'eau de mer filtrée. La figure 2 présente les détails et résultats de l'expérience.

- 5 Le rendement en ordonnées (%) correspond au rapport du nombre de chromosomes mesurés par rapport à la quantité initiale en bactéries dans l'échantillon.

 Alors que l'EMA à 3 µg/ml agit aussi sur l'ADN des cellules vivantes lorsque la phase d'illumination est de 20 minutes, 10 minutes
10 d'illumination suffisent pour ponter la totalité de l'ADN des cellules mortes et de l'ADN libre, tout en évitant l'action de l'EMA sur les cellules vivantes dans un échantillon dépourvu de bactéries mortes.

 D'autre part, il est important de noter qu'un dénombrement sur milieux gélosés après le traitement à l'EMA ne permet pas de mesurer
15 le nombre de cellules vivantes dans l'échantillon. En effet, même s'il n'endommage pas l'ADN des bactéries vivantes, l'azoture d'éthidium semble léser les cellules vivantes et perturber leur développement.

Exemple 3 : Condition de mise en œuvre de l'étape d'extraction de l'ADN par chauffage en fonction de la durée d'incubation à 95°C

20 A l'étape 3 d'extraction de l'ADN bactérien, tout l'ADN libre ainsi que celui des bactéries mortes est ponté par l'EMA. L'ADN des bactéries vivantes doit maintenant être libéré dans le milieu afin d'être récupéré puis dosé en PCR quantitative. Une incubation dans un bain-marie porté à 95°C suivie d'une incubation dans la glace permet de
25 lyser les bactéries. Cependant, une incubation à 95°C trop longue altère l'ADN libéré par les cellules après leur lyse.

 La figure 3 présente les résultats du test qui a permis de déterminer la durée optimale de ce temps d'incubation de l'échantillon.

On peut remarquer que la quantité de chromosomes estimée par la PCR quantitative diminue en fonction du temps d'incubation à 95°C. 5 minutes sont nécessaires pour assurer la lyse de toutes les cellules, quelle que soit la concentration initiale en bactérie. Au-delà de 5 minutes, on remarque que le nombre de chromosomes mesuré par PCR quantitative décroît. Une durée d'incubation de 5 minutes est suffisante et évite certains dommages de l'ADN bactérien après la lyse des cellules.

REVENDICATIONS

1. Procédé de quantification de bactéries vivantes dans un milieu liquide, de préférence milieu aqueux, susceptible d'en contenir caractérisé en ce qu'on réalise les étapes successives suivantes dans
- 5 lesquelles :
- a/ on ajoute des levures dans le dit échantillon et on réalise un mélange sous agitation, et
- b/ on sépare un résidu solide constitué d'un précipité contenant toutes les levures et bactéries contenues dans le dit échantillon,
- 10 c/ on re-suspend le dit résidu solide dans une solution tamponnée à pH de 7 à 8, de préférence un tampon Tris 40mM à pH 7,6 et on y ajoute un composé chimique ou biologique, apte, dans des conditions de concentration et/ou de traitement, à provoquer la liaison dudit composé spécifiquement à l'ADN des bactéries mortes sans
- 15 provoquer la lyse ou dégradation des parois des bactéries vivantes ni la liaison à l'ADN des bactéries vivantes, ledit composé dénommé composé inhibiteur étant apte à empêcher ainsi l'amplification par PCR de l'ADN qui lui est lié, et
- d/ on sépare une fraction contenant un résidu solide contenant
- 20 toutes les levures et bactéries, et
- e/ on la chauffe ledit résidu solide, de préférence au bain marie, à une température de pas plus de 100°C, de préférence à 95°C pendant 5 à 10 minutes, de manière à lyser toutes les bactéries sans provoquer la lyse des levures, et
- 25 f/ on sépare une fraction contenant toutes les levures et débris de bactéries lysées et on récupère une fraction contenant l'ADN bactérien, et

g/ on met en œuvre une quantification par amplification par PCR, de préférence par PCR en temps réel, de l'ADN provenant desdites bactéries initialement vivantes dans l'échantillon de départ.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'à l'étape g/, on réalise la quantification des bactéries vivantes du genre entérocoques et Escherichia Coli contenues dans un échantillon d'eau de baignade.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'à l'étape b/, on réalise la centrifugation de l'échantillon à au moins 5 000 g dans un récipient pendant au moins 10 minutes et on récupère le culot par élimination du surnageant.

4. Procédé selon la revendication 1 à 3, caractérisé en ce qu'à l'étape a), on utilise de la levure boulangère de *Saccharomyces cerevisiae*, la concentration en levures étant ajustée à une valeur de 200 à 400 µg/ml.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'à l'étape a/, on ajoute en outre dans l'échantillon une protéine coagulante telle que le sérum albumine bovine (BSA) à une concentration de 2 à 20 mg/ml dans l'échantillon pour favoriser l'adhérence du culot sur la paroi du récipient de centrifugation à l'étape b/.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'à l'étape c/, le dit composé inhibiteur est un agent intercalant photo-activable et on soumet la suspension à un traitement d'irradiation lumineuse d'activation de la liaison dudit agent intercalant avec l'ADN des bactéries mortes, ledit agent intercalant inhibant l'amplification par PCR dudit ADN auquel il est lié.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit agent intercalant est un azoture d'éthidium, de préférence l'EMA, à une concentration de 2 à 5 µg/ml et on soumet la suspension à une

irradiation lumineuse, en maintenant une température de suspension à la température ambiante, de préférence en trempant le récipient la contenant dans la glace.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'à l'étape d/, on réalise la dite séparation par centrifugation de la suspension obtenue après le traitement de l'étape c/, à au moins 5 000 g pendant au moins 10 minutes et élimination de la plus grande part du surnageant pour récupérer le culot contenant ledit résidu solide contenant toutes les levures et bactéries dans une petite fraction d'au moins 500 µl de la dite suspension, et on la chauffe à l'étape e/.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'à l'étape d/, on récupère au moins 99% des bactéries initialement contenues dans l'échantillon.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'à l'étape f/, on réalise la dite séparation par centrifugation de la suspension obtenue après le traitement de l'étape c/, à au moins 5000 g pendant au moins 5 minutes et élimination du culot contenant les levures intactes et les débris de bactéries lysées, pour récupérer le surnageant contenant ledit ADN bactérien.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'à l'étape g/ on réalise une étape préalable purification de l'ADN bactérien, de préférence sur colonne de silice ou une colonne de filtration membranaire de seuil de 30 KDa.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'à l'étape g/ on amplifie les bactéries E. Coli et entérocoques avec les couple d'amorces suivantes :

- pour les bactéries E. coli : une séquence spécifique tirée du gène 16S

- pour les bactéries du genre entérocoques : une séquence spécifique du genre *Enterococcus* tirées du gène *tuf*.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'étape g/ on ajoute dans l'échantillon d'ADN à quantifier une
5 concentration connue d'ADN synthétique non bactérien dénommé ADN alien.

14. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce qu'on utilise les oligonucléotides suivants choisis parmi :

10 - SEQ. ID. n°1 et 2 pour les amorces 5' et 3' des bactéries *E. Coli*, et

- SEQ. ID. n°3 et 4 pour les amorces 5' et 3' des bactéries entérocoques, et

15 - SEQ. ID. N°5 pour la séquence de contrôle interne d'ADN alien, et

- SEQ. ID. n°6 et 7 pour les amorces 5' et 3' de la séquence SEQ. ID. n°5.

15 20 15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que l'on peut détecter des concentrations de 2 à 10^8 bactéries vivantes/ml d'échantillons.

REVENDICATIONS MODIFIÉES

reçues par le Bureau international le 10 Septembre 2012 (10.09.2012)

1. Procédé de quantification de bactéries vivantes dans un milieu liquide, de préférence milieu aqueux, susceptible d'en contenir caractérisé en ce qu'on réalise les étapes successives suivantes dans
5 lesquelles :

a/ on ajoute des levures dans le dit échantillon et on réalise un mélange sous agitation, et

b/ on sépare un résidu solide constitué d'un précipité contenant toutes les levures et bactéries contenues dans le dit échantillon,

10 c/ on re-suspend le dit résidu solide dans une solution tamponnée à pH de 7 à 8, de préférence un tampon Tris 40mM à pH 7,6 et on y ajoute un composé intercalant photo-activable ou tout autre composé chimique ou biologique apte, dans des conditions de concentration et/ou de traitement, à provoquer la liaison dudit
15 composé spécifiquement à l'ADN des bactéries mortes sans provoquer la lyse ou dégradation des parois des bactéries vivantes ni la liaison à l'ADN des bactéries vivantes, ledit composé dénommé composé inhibiteur étant apte à empêcher ainsi l'amplification par PCR de l'ADN qui lui est lié, et

20 d/ on sépare une fraction contenant un résidu solide contenant toutes les levures et bactéries, et

e/ on la chauffe ledit résidu solide, de préférence au bain marie, à une température de pas plus de 100°C, de préférence à 95°C pendant 5 à 10 minutes, de manière à lyser toutes les bactéries sans provoquer
25 la lyse des levures, et

f/ on sépare une fraction contenant toutes les levures et débris de bactéries lysées et on récupère une fraction contenant l'ADN bactérien, et

g/ on met en œuvre une quantification par amplification par PCR, de préférence par PCR en temps réel, de l'ADN provenant desdites bactéries initialement vivantes dans l'échantillon de départ.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'à l'étape g/, on réalise la quantification des bactéries vivantes du genre entérocoques et *Escherichia Coli* contenues dans un échantillon d'eau de baignade.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'à l'étape b/, on réalise la centrifugation de l'échantillon à au moins 5 000 g dans un récipient pendant au moins 10 minutes et on récupère le culot par élimination du surnageant.

4. Procédé selon la revendication 1 à 3, caractérisé en ce qu'à l'étape a), on utilise de la levure boulangère de *Saccharomyces cerevisiae*, la concentration en levures étant ajustée à une valeur de 200 à 400 µg/ml.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'à l'étape a/, on ajoute en outre dans l'échantillon une protéine coagulante telle que le sérum albumine bovine (BSA) à une concentration de 2 à 20 mg/ml dans l'échantillon pour favoriser l'adhérence du culot sur la paroi du récipient de centrifugation à l'étape b/.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'à l'étape c/, le dit composé inhibiteur est un agent intercalant photo-activable et on soumet la suspension à un traitement d'irradiation lumineuse d'activation de la liaison dudit agent intercalant avec l'ADN des bactéries mortes, ledit agent intercalant inhibant l'amplification par PCR dudit ADN auquel il est lié.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit agent intercalant est un azoture d'éthidium, de préférence l'EMA, à une concentration de 2 à 5 µg/ml et on soumet la suspension à une

irradiation lumineuse, en maintenant une température de suspension à la température ambiante, de préférence en trempant le récipient la contenant dans la glace.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'à l'étape d/, on réalise la dite séparation par centrifugation de la suspension obtenue après le traitement de l'étape c/, à au moins 5 000 g pendant au moins 10 minutes et élimination de la plus grand part du surnageant pour récupérer le culot contenant ledit résidu solide contenant toutes les levures et bactéries dans une petite fraction d'au moins 500 µl de la dite suspension, et on la chauffe à l'étape e/.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'à l'étape d/, on récupère au moins 99% des bactéries initialement contenues dans l'échantillon.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'à l'étape f/, on réalise la dite séparation par centrifugation de la suspension obtenu après le traitement de l'étape c/, à au moins 5000 g pendant au moins 5 minutes et élimination du culot contenant les levures intactes et les débris de bactéries lysées, pour récupérer le surnageant contenant ledit ADN bactérien.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'à l'étape g/ on réalise une étape préalable purification de l'ADN bactérien, de préférence sur colonne de silice ou une colonne de filtration membranaire de seuil de 30 KDa.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'à l'étape g/ on amplifie les bactéries E. Coli et entérocoques avec les couple d'amorces suivantes :

- pour les bactéries E. coli : une séquence spécifique tirée du gène 16S

- pour les bactéries du genre entérocoques : une séquence spécifique du genre Enterococcus tirées du gène tuf.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'étape g/ on ajoute dans l'échantillon d'ADN à quantifier une concentration connue d'ADN synthétique non bactérien dénommé ADN alien.

14. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce qu'on utilise les oligonucléotides suivants choisis parmi :

10 - SEQ. ID. n°1 et 2 pour les amorces 5' et 3' des bactéries E. Coli, et

- SEQ. ID. n°3 et 4 pour les amorces 5' et 3' des bactéries entérocoques, et

15 - SEQ. ID. N°5 pour la séquence de contrôle interne d'ADN alien, et

- SEQ. ID. n°6 et 7 pour les amorces 5' et 3' de la séquence SEQ. ID. n°5.

15 20 15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que l'on peut détecter des concentrations de 2 à 10⁸ bactéries vivantes/ml d'échantillons.

1/1

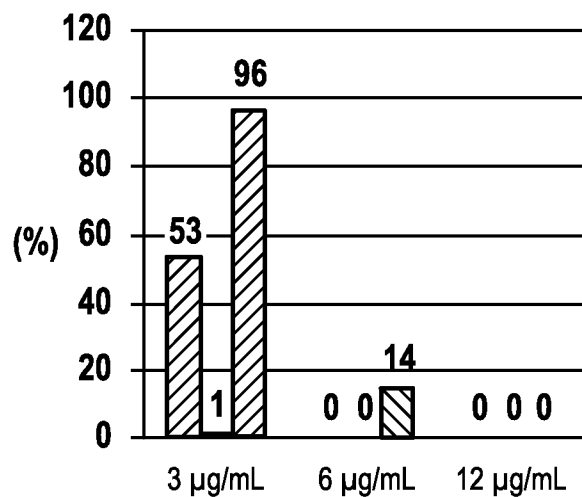


FIG.1

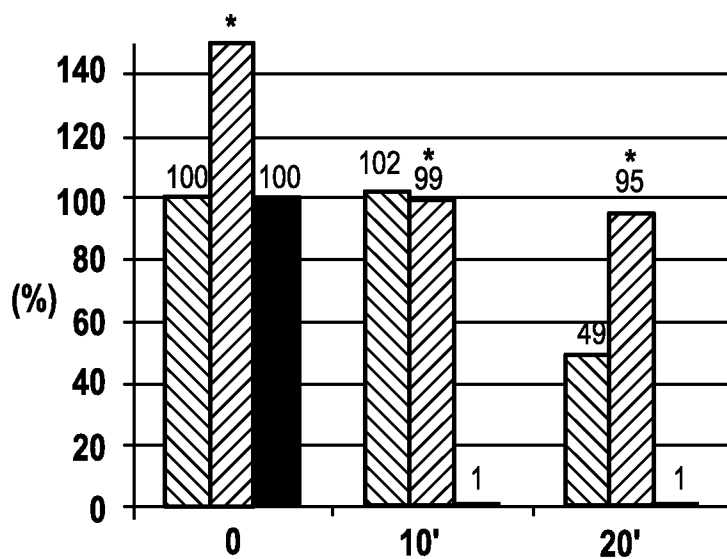


FIG.2

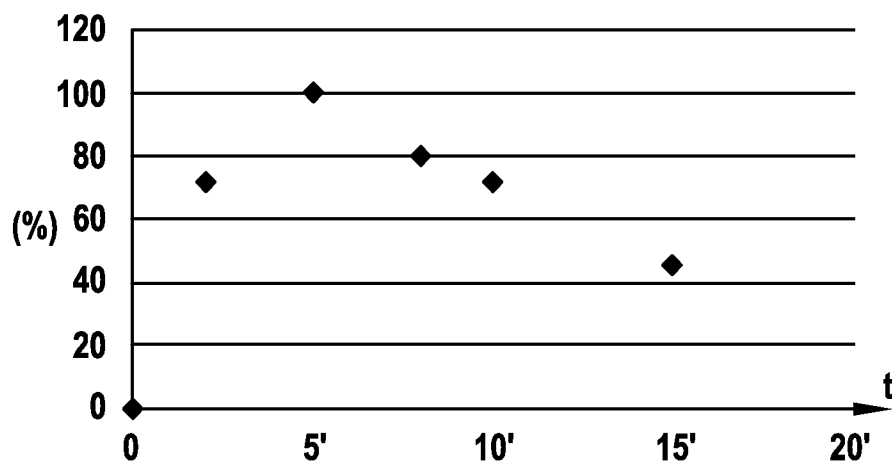


FIG.3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2012/050838

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68 C12N15/10 C07D221/12
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C12Q C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VARMA M ET AL: "Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater", WATER RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 43, no. 19, 1 November 2009 (2009-11-01), pages 4790-4801, XP026738132, ISSN: 0043-1354, DOI: 10.1016/J.WATRES.2009.05.031 [retrieved on 2009-05-29] the whole document ----- -/--	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 July 2012

Date of mailing of the international search report

20/07/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Werner, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2012/050838

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SOEJIMA T ET AL: "Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria", MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, CENTER FOR ACADEMIC PUBLICATIONS JAPAN, JP, vol. 51, 1 August 2007 (2007-08-01), pages 763-775, XP008107488, ISSN: 0385-5600 abstract -----	1-15
A	WO 01/77379 A2 (MATFORSK [NO]; GARDNER REBECCA [GB]; RUDI KNUT [NO]) 18 October 2001 (2001-10-18) cited in the application abstract page 7; examples 2, 4 -----	1-15
A	WO 2007/100762 A2 (UNIV MONTANA STATE [US]; NOCKER ANDREAS [US]; CAMPER ANNE K [US]) 7 September 2007 (2007-09-07) cited in the application abstract page 3, line 18 - page 4, line 21; claims 1, 20-21 examples 11-15 -----	1-15
A	NOCKER ANDREAS ET AL: "Discrimination between live and dead cells in bacterial communities from environmental water samples analyzed by 454 pyrosequencing", INTERNATIONAL MICROBIOLOGY, vol. 13, no. 2, June 2010 (2010-06), pages 59-65 URL, XP002671329, ISSN: 1139-6709 abstract -----	1-15
A	J. JOFRE ET AL: "Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 109, no. 6, 1 December 2010 (2010-12-01), pages 1853-1867, XP055021675, ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04830.x abstract page 1857, column 2, paragraph 4 - page 1861, column 1, paragraph 2 ----- -/--	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2012/050838

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HORÁKOVÁ K ET AL: "Evaluation of methods for isolation of DNA for polymerase chain reaction (PCR)-based identification of pathogenic bacteria from pure cultures and water samples.", WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY : A JOURNAL OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION ON WATER POLLUTION RESEARCH 2008 LNKD-PUBMED:18824796, vol. 58, no. 5, 2008, pages 995-999, XP002671330, ISSN: 0273-1223 the whole document -----	1-15
A	C. GARCIA-ALJARO ET AL: "Combined use of an immunomagnetic separation method and immunoblotting for the enumeration and isolation of Escherichia coli 0157 in wastewaters", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 98, no. 3, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 589-597, XP055021706, ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02497.x abstract -----	1-15
A	MORALES-MORALES H A ET AL: "Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 20030701 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US, vol. 69, no. 7, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 4098-4102, XP002671331, DOI: DOI:10.1128/AEM.69.7.4098-4102.2003 abstract -----	1-15
A	WO 2007/023181 A1 (QIAGEN GMBH [DE]; DENNIG JOERG [DE]; MAGYAR SILVIA [DE]; ERBACHER CHRI) 1 March 2007 (2007-03-01) the whole document -----	1-15
A	DE 10 2006 020463 A1 (SARTORIUS GMBH [DE]) 7 December 2006 (2006-12-07) abstract; figure 1 ----- -/--	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2012/050838

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WHITING ET AL: "Detection of <i>Pediococcus</i> spp. in brewing yeast by a rapid immunoassay.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 58, no. 2, 1 February 1992 (1992-02-01), pages 713-716, XP055021682, ISSN: 0099-2240 page 715, column 1, paragraph 4 -----	1-15
A	ROMPRE A ET AL: "Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches", JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 49, no. 1, 1 March 2002 (2002-03-01), pages 31-54, XP002359233, ISSN: 0167-7012, DOI: 10.1016/S0167-7012(01)00351-7 the whole document page 41, column 2, paragraph 3 - page 45, column 2, paragraph 1 -----	1-15
A	WO 03/052143 A2 (ANGLES D AURIAC MARC B [NO]; SIREVAAG REIDUN [NO]) 26 June 2003 (2003-06-26) abstract page 14; table 2 -----	14
T	Leger G., Mejean V., Raptelet F.: "La qPCR-abo, une méthode rapide et innovante pour l'analyse des eaux de baignade", Rencontres eaux de baignade, Cassis, 07 juin 2011 7 June 2011 (2011-06-07), XP002671332, Retrieved from the Internet: URL: http://www.rencontres-eauxdebaignade.com/2011/res/TR2-SEM.pdf [retrieved on 2012-03-12] the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2012/050838

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see supplemental sheet PCT/ISA/210

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box II.2**Claim 1-15 (in part)**

Step (c) of claim 1 fails to comply with the requirement of clarity, since the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. The claim attempts to define the subject matter in terms of the result sought, in particular a chemical or biological inhibiting compound suitable for binding with the DNA of dead bacteria without causing the lysis or degradation of the walls of live bacteria or binding with the DNA of live bacteria, and also suitable for preventing PCR amplification of the DNA bound thereto. This definition merely amounts to stating the basic problem without indicating the technical features necessary for achieving this result. The invention is not sufficiently disclosed for a person skilled in the art, calling upon his or her general knowledge, to carry out the invention over the entirety of the claimed range without requiring undue effort and/or without exercising inventive step. However, the description gives the impression that this function can only be carried out in a specific manner, namely by specific photoactivatable intercalating agents, EMA or PMA, for which the claimed effect appears to have been demonstrated (see claims 6-7 and page 7, lines 19-20). Therefore, the claim, in its current extent, is not supported by the description. The resulting lack of clarity under PCT Article 6 is such that it is impossible for a meaningful search to be carried out in respect of the subject matter of claims 1-15. A search can therefore be carried out only for the parts of the application that seem clear and sufficiently disclosed and supported by the description, namely the specific photoactivatable intercalating agents (claim 6) represented by EMA or PMA (claim 7).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on subject matter that has not been searched. This applies whether or not the claims were amended after receipt of the search report or during any Chapter II procedure. The applicant is reminded that if the application proceeds to the regional phase before the EPO, an additional search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines, C-VI, 8.2), provided that the problems which led to the declaration under PCT Article 17(2) have been resolved.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2012/050838

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0177379	A2	18-10-2001	AU 4671201 A 23-10-2001
		CA 2405769 A1 18-10-2001	
		EP 1272664 A2 08-01-2003	
		JP 4340734 B2 07-10-2009	
		JP 2003530118 A 14-10-2003	
		NO 20024879 A 10-12-2002	
		US 2003203374 A1 30-10-2003	
		WO 0177379 A2 18-10-2001	
WO 2007100762	A2	07-09-2007	EP 2004843 A2 24-12-2008
			JP 2009528058 A 06-08-2009
			US 2010035250 A1 11-02-2010
			WO 2007100762 A2 07-09-2007
WO 2007023181	A1	01-03-2007	DE 102005040259 A1 01-03-2007
			EP 1920047 A1 14-05-2008
			EP 1920055 A1 14-05-2008
			JP 2009505646 A 12-02-2009
			JP 2009507781 A 26-02-2009
			US 2009018323 A1 15-01-2009
			US 2009023205 A1 22-01-2009
			WO 2007023057 A1 01-03-2007
			WO 2007023181 A1 01-03-2007
DE 102006020463	A1	07-12-2006	NONE
WO 03052143	A2	26-06-2003	AT 342380 T 15-11-2006
			AU 2002351524 A1 30-06-2003
			CA 2471230 A1 26-06-2003
			EP 1466011 A2 13-10-2004
			US 2005130155 A1 16-06-2005
			WO 03052143 A2 26-06-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2012/050838

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12Q1/68 C12N15/10 C07D221/12
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N C12Q C07D

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	VARMA M ET AL: "Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater", WATER RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 43, no. 19, 1 novembre 2009 (2009-11-01), pages 4790-4801, XP026738132, ISSN: 0043-1354, DOI: 10.1016/J.WATRES.2009.05.031 [extrait le 2009-05-29] le document en entier ----- -/-	1-15



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 juillet 2012

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/07/2012

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Werner, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Demande internationale n°
PCT/FR2012/050838

Cadre n°. II Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes :

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :

2. ☒ Les revendications n° 1-15(en partie)
parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier :

voir FEUILLE ANNEXÉE PCT/ISA/210

3. ☐ Les revendications n°
parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre n°. III Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. ☐ Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature.

3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:

4. ☐ Aucune taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°.

- Remarque quant à la réserve**
- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.
- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SOEJIMA T ET AL: "Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria", MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, CENTER FOR ACADEMIC PUBLICATIONS JAPAN, JP, vol. 51, 1 août 2007 (2007-08-01), pages 763-775, XP008107488, ISSN: 0385-5600 abrégé -----	1-15
A	WO 01/77379 A2 (MATFORSK [NO]; GARDNER REBECCA [GB]; RUDI KNUT [NO]) 18 octobre 2001 (2001-10-18) cité dans la demande abrégé page 7; exemples 2, 4 -----	1-15
A	WO 2007/100762 A2 (UNIV MONTANA STATE [US]; NOCKER ANDREAS [US]; CAMPER ANNE K [US]) 7 septembre 2007 (2007-09-07) cité dans la demande abrégé page 3, ligne 18 - page 4, ligne 21; revendications 1, 20-21 exemples 11-15 -----	1-15
A	NOCKER ANDREAS ET AL: "Discrimination between live and dead cells in bacterial communities from environmental water samples analyzed by 454 pyrosequencing", INTERNATIONAL MICROBIOLOGY, vol. 13, no. 2, juin 2010 (2010-06), pages 59-65 URL, XP002671329, ISSN: 1139-6709 abrégé -----	1-15
A	J. JOFRE ET AL: "Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 109, no. 6, 1 décembre 2010 (2010-12-01), pages 1853-1867, XP055021675, ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04830.x abrégé page 1857, colonne 2, alinéa 4 - page 1861, colonne 1, alinéa 2 ----- -/--	1-15

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HORÁKOVÁ K ET AL: "Evaluation of methods for isolation of DNA for polymerase chain reaction (PCR)-based identification of pathogenic bacteria from pure cultures and water samples.", WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY : A JOURNAL OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION ON WATER POLLUTION RESEARCH 2008 LNKD-PUBMED:18824796, vol. 58, no. 5, 2008, pages 995-999, XP002671330, ISSN: 0273-1223 le document en entier -----	1-15
A	C. GARCIA-ALJARO ET AL: "Combined use of an immunomagnetic separation method and immunoblotting for the enumeration and isolation of Escherichia coli 0157 in wastewaters", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 98, no. 3, 1 mars 2005 (2005-03-01), pages 589-597, XP055021706, ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02497.x abrégé -----	1-15
A	MORALES-MORALES H A ET AL: "Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 20030701 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US, vol. 69, no. 7, 1 juillet 2003 (2003-07-01), pages 4098-4102, XP002671331, DOI: DOI:10.1128/AEM.69.7.4098-4102.2003 abrégé -----	1-15
A	WO 2007/023181 A1 (QIAGEN GMBH [DE]; DENNIG JOERG [DE]; MAGYAR SILVIA [DE]; ERBACHER CHRI) 1 mars 2007 (2007-03-01) le document en entier -----	1-15
A	DE 10 2006 020463 A1 (SARTORIUS GMBH [DE]) 7 décembre 2006 (2006-12-07) abrégé; figure 1 ----- -/--	1-15

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WHITING ET AL: "Detection of <i>Pediococcus</i> spp. in brewing yeast by a rapid immunoassay.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 58, no. 2, 1 février 1992 (1992-02-01), pages 713-716, XP055021682, ISSN: 0099-2240 page 715, colonne 1, alinéa 4 -----	1-15
A	ROMPRE A ET AL: "Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches", JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 49, no. 1, 1 mars 2002 (2002-03-01), pages 31-54, XP002359233, ISSN: 0167-7012, DOI: 10.1016/S0167-7012(01)00351-7 le document en entier page 41, colonne 2, alinéa 3 - page 45, colonne 2, alinéa 1 -----	1-15
A	WO 03/052143 A2 (ANGLES D AURIAC MARC B [NO]; SIREVAAG REIDUN [NO]) 26 juin 2003 (2003-06-26) abrégé page 14; tableau 2 -----	14
T	Leger G., Mejean V., Raptelet F.: "La qPCR-abo, une méthode rapide et innovante pour l'analyse des eaux de baignade", Rencontres eaux de baignade, Cassis, 07 juin 2011 7 juin 2011 (2011-06-07), XP002671332, Extrait de l'Internet: URL: http://www.rencontres-eauxdebaignade.com/2011/res/TR2-SEM.pdf [extrait le 2012-03-12] le document en entier -----	1-15

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre II.2

Revendications nos.: 1-15(en partie)

L'étape (c) de la revendication 1 ne satisfait pas à l'exigence de clarté, car l'objet de la protection demandée n'est pas clairement défini. Elle tente de définir l'objet par le résultat recherché, notamment un composé chimique ou biologique inhibiteur, apte à provoquer sa liaison à l'ADN des bactéries mortes sans provoquer la lyse ou dégradation des parois des bactéries vivantes ni la liaison à l'ADN des bactéries vivantes, et apte à empêcher l'amplification par PCR de l'ADN qui lui est lié. Cette définition revient simplement à énoncer le problème sous-jacent, sans indiquer les caractéristiques techniques nécessaires pour parvenir à ce résultat. L'invention n'est pas exposée avec suffisamment d'informations pour que l'homme du métier puisse, en s'aidant de ses connaissances générales, réaliser l'invention dans l'intégralité du domaine revendiqué sans déployer des efforts excessifs et/ou sans faire preuve d'esprit inventif. Cependant, la description donne l'impression que cette fonction ne peut être exécutée que d'une façon particulière, en l'occurrence par des agents intercalants photoactivables spécifiques, l'EMA ou le PMA, pour qui l'effet réclamé aurait été démontré (voir les revendications 6-7 et p.7 l.9-20). Donc la revendication dans son étendue actuelle ne se fonde pas sur la description. Le manque de clarté au sens de l'art. 6 PCT qui s'en suit est d'une importance telle qu'une recherche significative de l'objet des revendications 1-15 devient impossible. Par conséquent, une recherche ne peut être effectuée que pour les parties de la demande qui apparaissent être claires, suffisamment exposées et fondées sur la description, c.-à-d. les agents intercalants photoactivables spécifiques (revendication 6), représentés par l'EMA ou le PMA (revendication 7).

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II. Si la demande devait être poursuivie dans la phase régionale devant l'OEB, il est rappelé au déposant qu'une recherche pourrait être effectuée durant la procédure d'examen devant l'OEB (voir Directive OEB C-VI, 8.2) à condition que les problèmes ayant conduit à la déclaration conformément à l'Article 17(2) PCT aient été résolus.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2012/050838

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0177379	A2	18-10-2001	AU 4671201 A	23-10-2001
			CA 2405769 A1	18-10-2001
			EP 1272664 A2	08-01-2003
			JP 4340734 B2	07-10-2009
			JP 2003530118 A	14-10-2003
			NO 20024879 A	10-12-2002
			US 2003203374 A1	30-10-2003
			WO 0177379 A2	18-10-2001

WO 2007100762	A2	07-09-2007	EP 2004843 A2	24-12-2008
			JP 2009528058 A	06-08-2009
			US 2010035250 A1	11-02-2010
			WO 2007100762 A2	07-09-2007

WO 2007023181	A1	01-03-2007	DE 102005040259 A1	01-03-2007
			EP 1920047 A1	14-05-2008
			EP 1920055 A1	14-05-2008
			JP 2009505646 A	12-02-2009
			JP 2009507781 A	26-02-2009
			US 2009018323 A1	15-01-2009
			US 2009023205 A1	22-01-2009
			WO 2007023057 A1	01-03-2007
			WO 2007023181 A1	01-03-2007

DE 102006020463	A1	07-12-2006	AUCUN	

WO 03052143	A2	26-06-2003	AT 342380 T	15-11-2006
			AU 2002351524 A1	30-06-2003
			CA 2471230 A1	26-06-2003
			EP 1466011 A2	13-10-2004
			US 2005130155 A1	16-06-2005
			WO 03052143 A2	26-06-2003
