



Office de la Propriété

Intellectuelle  
du CanadaUn organisme  
d'Industrie CanadaCanadian  
Intellectual Property  
OfficeAn agency of  
Industry Canada

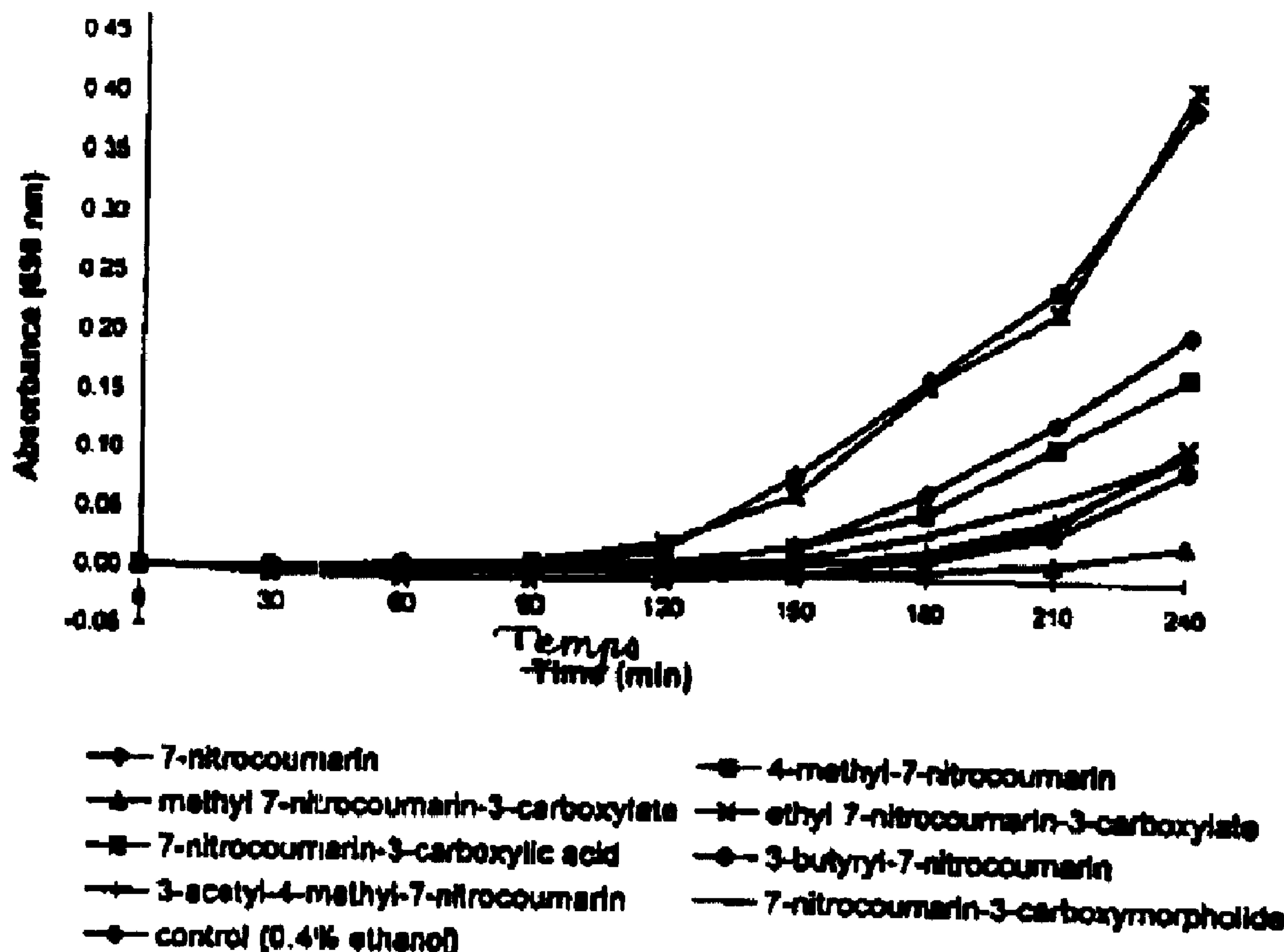
CA 2348710 C 2011/09/13

(11)(21) **2 348 710**(12) **BREVET CANADIEN**  
**CANADIAN PATENT**(13) **C**

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1999/11/05  
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2000/05/18  
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2011/09/13  
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2001/05/01  
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1999/002704  
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2000/028073  
(30) Priorité/Priority: 1998/11/05 (FR98/14101)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12Q 1/04* (2006.01),  
*C07D 311/16* (2006.01), *C12Q 1/26* (2006.01)  
(72) Inventeurs/Inventors:  
JAMES, ARTHUR, GB;  
MONGET, DANIEL, FR  
(73) Propriétaire/Owner:  
BIOMERIEUX S.A., FR  
(74) Agent: SMART & BIGGAR

(54) Titre : NITROCOUMARINES POUR LA DETECTION DE TOUS MICRO-ORGANISMES  
(54) Title: NITROCOUMARINS FOR DETECTING ALL MICRO-ORGANISMS



## (57) Abrégé/Abstract:

La présente invention concerne un composé de détection de la présence ou de l'absence d'au moins un micro-organisme. L'invention propose également l'utilisation d'un composé dans un test de détection et/ou de diagnostic. Ladite invention a encore

**(57) Abrégé(suite)/Abstract(continued):**

pour objet un procédé de mise en évidence d'une activité nitroaryl-réductase dans un milieu de culture de bactéries. L'invention a enfin trait à l'utilisation d'un tel composé, à des procédés de mise en évidence et de détection d'un micro-organisme ou d'un groupe de micro-organismes dans un échantillon susceptible de les contenir, et enfin à différentes applications. Elle se caractérise par le fait que le composé est constitué par une molécule de nitrocoumarine ou un de ses dérivés, qui est fluorescent à l'état réduit. L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic.



PCT

# **ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE**

## **Bureau international**

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :  C12Q 1/04, C07D 311/16, C12Q 1/26		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/28073  (43) Date de publication internationale: 18 mai 2000 (18.05.00)
(21) Numéro de la demande internationale:	PCT/FR99/02704	(81) Etats désignés:	AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Date de dépôt international:	5 novembre 1999 (05.11.99)	(30) Données relatives à la priorité:	98/14101 5 novembre 1998 (05.11.98) FR
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):  BIOMERIEUX S.A. [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR).		(72) Inventeurs; et  (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): JAMES, Arthur [GB/GB]; 12 Wolseley Gdns, Jesmond, Newcastle-upon-Tyne NE2 1HR (GB). MONGET, Daniel [FR/FR]; Résidence du Moulin, 13, rue Moulin du Buis, F-01150 Saint Sorlin en Bugey (FR).	(74) Mandataire: BONNEAU, Gérald; Cabinet Bonneau, 7, avenue Gazan, F-06600 Antibes (FR).
		Publiée	Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: NITROCOUMARINS FOR DETECTING ALL MICRO-ORGANISMS

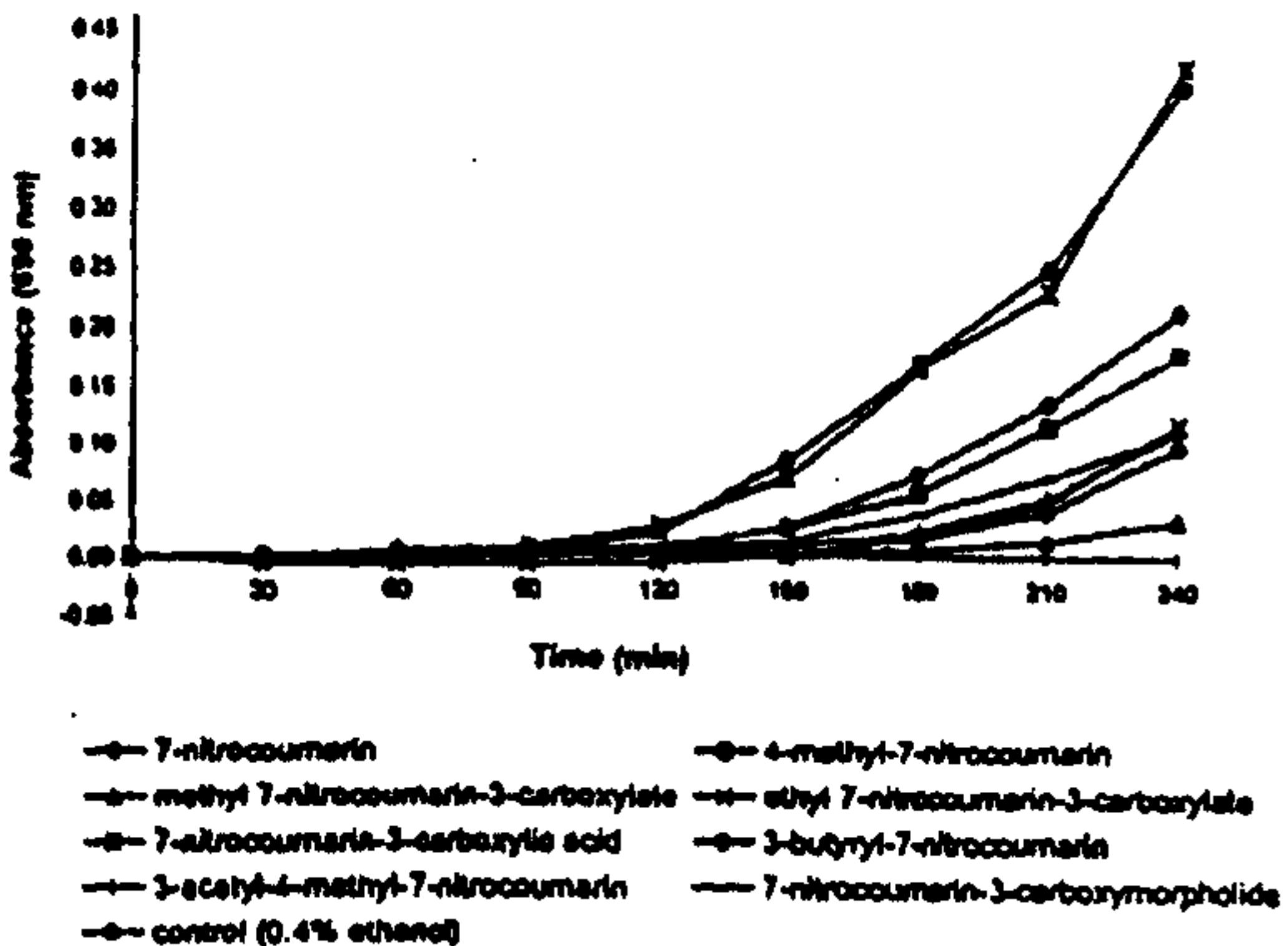
(54) Titre: NITROCOUMARINES POUR LA DETECTION DE TOUS MICRO-ORGANISMES

**(57) Abstract**

The invention concerns a compound for detecting the presence or absence of at least a micro-organism. The invention also concerns the use of a compound in a detection and/or diagnostic test. The invention further concerns a method for isolating a nitroaryl-reductase activity in a bacteria culture medium. Finally, the invention concerns the use of such a compound, methods for isolating and detecting micro-organisms in a sample likely to contain them, and various applications thereof. The invention is characterised in that the compound consists of a nitrocoumarin molecule or one of its derivatives, which is fluorescent in reduced state. The invention is particularly applicable in the field of diagnosis.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un composé de détection de la présence ou de l'absence d'au moins un micro-organisme. L'invention propose également l'utilisation d'un composé dans un test de détection et/ou de diagnostic. Ladite invention a encore pour objet un procédé de mise en évidence d'une activité nitroaryl-réductase dans un milieu de culture de bactéries. L'invention a enfin trait à l'utilisation d'un tel composé, à des procédés de mise en évidence et de détection d'un micro-organisme ou d'un groupe de micro-organismes dans un échantillon susceptible de les contenir, et enfin à différentes applications. Elle se caractérise par le fait que le composé est constitué par une molécule de nitrocoumarine ou un de ses dérivés, qui est fluorescent à l'état réduit. L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic.



## NITROCOUMARINES POUR LA DETECTION DE TOUS MICRO-ORGANISMES

## DESCRIPTION

La présente invention concerne un composé nitro-aromatique capable d'être réduit en un produit amino-aromatique par des micro-organismes.

5 L'invention propose également l'utilisation d'un composé dans un test de détection et/ou de diagnostic de micro-organismes.

Ladite invention a encore pour objet un procédé de mise en évidence d'une activité nitroaryl-réductase dans un milieu de culture de micro-organismes.

10 L'invention a enfin trait à un procédé de détection d'un micro-organisme ou d'un groupe de micro-organismes dans un échantillon susceptible de les contenir.

15 L'article « *Syntheses of coumarin derivatives. V. Syntheses of coumarin-3-carboxylic acid derivatives.* » CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 50, 1956, page 10715, XP-002109446, décrit la synthèse de dérivés de nitrocumarines et même de 7-nitrocumarines. La seule application qui soit décrite concerne des actions hypnotique et sédative. De plus, des études de toxicité ont été réalisées. L'article « *Syntheses of coumarin derivatives. XIV. Preparation of 5-hydroxy-7-nitro-3-coumarincarboxylic acid* » CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 59, 1963, page 2757, XP-002109447, ne décrit quant à lui que la synthèse de l'acide 5-hydroxy-7-nitrocumarine carboxylique.

20 L'utilisation de ces molécules dans la détection de la présence ou de l'absence de micro-organismes n'est jamais abordée. Il n'y a donc aucune application à la bactériologie qui soit envisagée. De plus, l'étude de toxicité n'engage pas l'homme du métier à penser pouvoir utiliser de tels composés dans des milieux de culture pour la bactériologie qui permettent la croissance de micro-organismes.

25 Certains produits synthétisés ci-dessus peuvent avoir une application à des fins thérapeutiques, certains en particulier pouvant avoir des propriétés antibactériennes. C'est ce que révèle les deux articles suivants. Ainsi, l'article « *Studies on Synthesis of Coumarin Derivatives. XX. Synthesis and Antibacterial Activity of Derivatives of N-Substituted 3-Coumarincarboxamide* » CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL 30 BULLETIN, vol. 16, no. 11, novembre 1968 (1968-11) pages 2093-2100, XP-

002109448, décrit l'utilisation de nitrocoumarines dans des tests antibactériens, ce qui est également le cas de l'article « *Synthesis of Coumarin Derivatives. XV. On the Preparation of Ethyl Pyranobenzoxazole carboxylates.* » *CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN*, vol. 14, 1966, pages 1162-1167, XP-002109449.

5 Néanmoins dans notre invention, la propriété essentielle qui nous intéresse est la possibilité pour les nitrocoumarines et plus particulièrement les 7-nitrocoumarines d'être fluorescentes à l'état réduit. Cette fluorescence est caractéristique de la présence ou de l'absence de certains micro-organismes. Or la toxicité et les propriétés antibactériennes ne peuvent que détourner l'homme du métier de toutes velléités 10 d'utiliser de telles molécules pour détecter des micro-organismes.

15 L'objet de notre demande de brevet est tout à fait différent. Il ne s'agit en aucun cas de rechercher une activité thérapeutique, comme l'inhibition de la croissance bactérienne, mais au contraire de mettre en évidence des micro-organismes par la recherche d'une activité enzymatique de type nitro-réductase qui réduit la 7-nitrocoumarine non fluorescente (ou dérivé) en 7-aminocoumarine fluorescente (ou dérivé). Il s'agit donc d'un test fluorescent de détection universelle de micro-organismes dans un échantillon susceptible de les contenir, où il n'y a aucun intérêt à avoir une inhibition bactérienne.

20 La capacité de certaines bactéries à réduire les composés nitro-aromatiques est connue depuis de nombreuses années. Asnis (1957) a rapporté l'isolation d'une flavoprotéine à partir d'extraits d'*E. coli* qui était capable de réduire l'acide p-nitrobenzoïque. Depuis ce rapport, l'activité nitroaryl-réductase a été identifiée dans diverses variétés d'organismes. Ceci inclut des aérobies strictes tels que *Pseudomonas* spp. (Won et al. 1974) et *Nocardia* spp. (Villanueva 1964), des anaérobies strictes tels que *Clostridium* spp. (Ancermaier & Simon 1983) et *Veillonella* spp. (McCormick et al. 25 1976), ou encore des champignons (Masuda & Ozaki 1993) et des parasites eucaryotes (Douch 1975). Il existe une gamme de substrats qui ont été désignés comme étant susceptibles d'être réduits par des nitroaryl-réductases bactériennes. Il s'agit surtout de composés nitro-aromatiques tels que l'acide p-nitrobenzoïque, le p-nitrophénol, la p-nitroaniline et le 2, 4, 6-trinitrotoluène (McCormick et al. 1976).

85466-36

Bien qu'une grande diversité de substrats soit disponible, aucun ne permet la détection directe de nitroaryl-réductases, en donnant un produit fluorescent.

*La détection de l'activité enzymatique doit donc être réalisée par des méthodes indirectes telles que le suivi de la disparition du substrat ou d'un cofacteur. Kitamura et al. (1983) ont étudié la réduction du méthyl p-nitrobenzoate et d'une gamme d'autres composés aromatiques nitrés avec des extraits d'*E. coli*. Ils ont montré que trois activités enzymatiques distinctes pouvaient être isolées en utilisant la chromatographie avec une colonne DEAE-cellulose et que les trois fractions bien définies avaient des besoins différents en cofacteur pour leur activité. La première est liée à la présence de NADH, la seconde à la présence de NADPH, et la troisième à la présence d'un des deux. La réactivité de ces enzymes a été mesurée en contrôlant la diminution de densité optique (D.O.) à 340 nanomètre (nm), corrélée à la disparition de NADH et/ou de NADPH. La diminution de NADH et/ou NADPH a été associée à la formation de deux produits de réaction, le méthyl p-aminobenzoate et le méthyl p-hydroxylaminobenzoate. Bryant et al. (1981) ont également étudié les nitroaryl-réductases de *E. coli* en utilisant la nitrofurazone comme substrat. Pour mesurer l'activité enzymatique, ils ont pu contrôler la diminution de D.O. à 375 nm, qui correspond à la longueur d'onde maximale ( $\lambda$  max.) de la nitrofurazone. En utilisant cette méthode, ils ont pu mettre en évidence trois activités enzymatiques distinctes capables de réduire la nitrofurazone. La capacité qu'ont les bactéries de réduire les nitrofuranes est d'un intérêt considérable en chimiothérapie antimicrobienne (Peterson et al. 1979, Wentzell & McCalla 1980). En effet, il a été montré que l'activité nitroaryl-réductase majeure chez *E. coli*, qui est uniquement dépendante de la présence de NADPH comme cofacteur, est absente chez les mutants résistants à la nitrofurazone (Bryant et al. 1981).*

85466-36

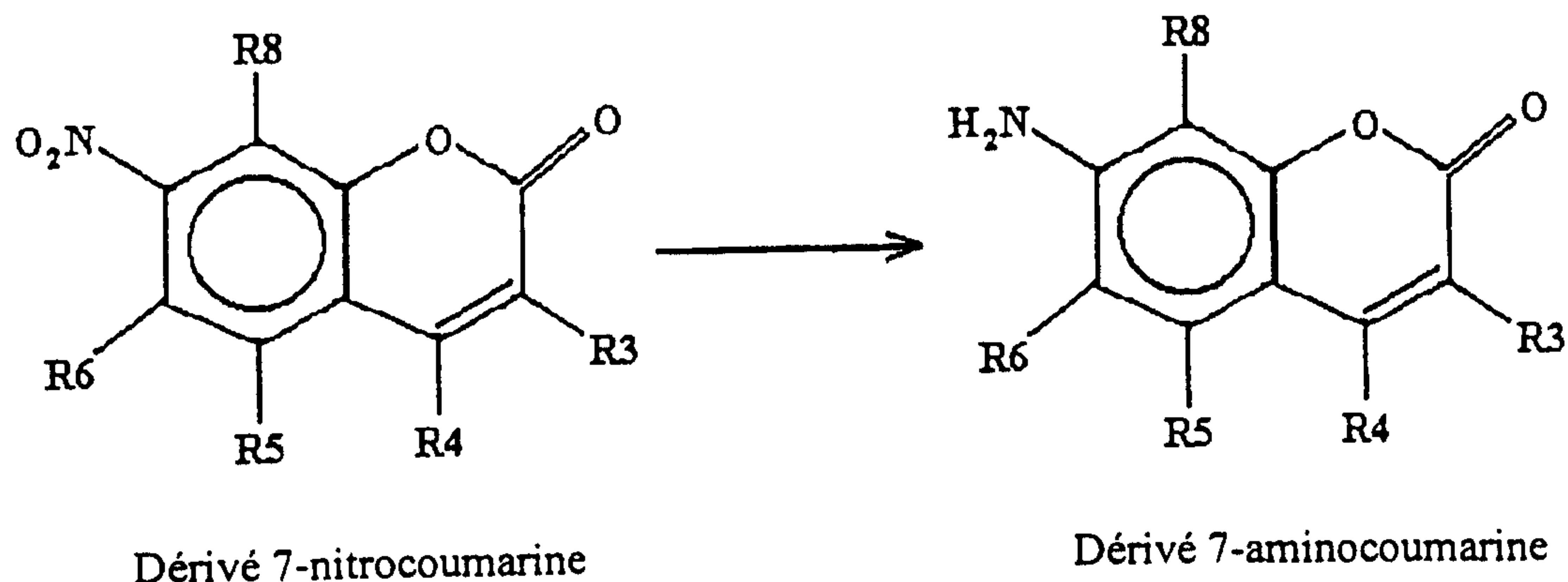
3a

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un composé dans un test de détection ou dans un test de diagnostic ou les deux de la présence ou de l'absence de micro-organismes qui présentent une activité enzymatique de type nitro-réductase, dans laquelle le composé est constitué par une molécule 5 de 7-nitrocoumarine ou un de ses dérivés.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection d'un micro-organisme qui présentent une activité enzymatique de type nitro-réductase ou d'un groupe de micro-organismes qui présentent une activité enzymatique de type nitro-réductase dans un échantillon à analyser, comprenant les étapes consistant à 10 ajouter à un milieu de culture, contenant l'échantillon, au moins un composé, à base de 7-nitrocoumarine ou un de ses dérivés, et rechercher la formation d'un produit fluorescent, la présence ou l'absence de cette fluorescence permettant de conclure respectivement à la présence ou à l'absence du micro-organisme ou du groupe de micro-organismes recherché.

15 La présente invention a également pour objet un procédé d'identification d'au moins un micro-organisme qui présentent une activité enzymatique de type nitro-réductase dans un échantillon à analyser comprenant les étapes suivantes ajouter dans différents puits d'identification un milieu de culture, contenant chacun une seule source de carbone, une fraction de l'échantillon à analyser et au moins un composé, à 20 base de 7-nitrocoumarine ou un de ses dérivés, et rechercher la formation d'un produit fluorescent, dans chaque puits, la présence ou l'absence de cette fluorescence sur l'ensemble des puits permet d'identifier le micro-organisme.

La présente invention a pour objet un substrat fluorogène à base de 25 nitrocoumarine pour la détection directe des activités nitroaryl-réductases. Ce type de composé nitro-aromatique est capable de produire, après réduction, un composé très fluorescent qui est donc facilement détectable. Cette réaction I est la suivante :



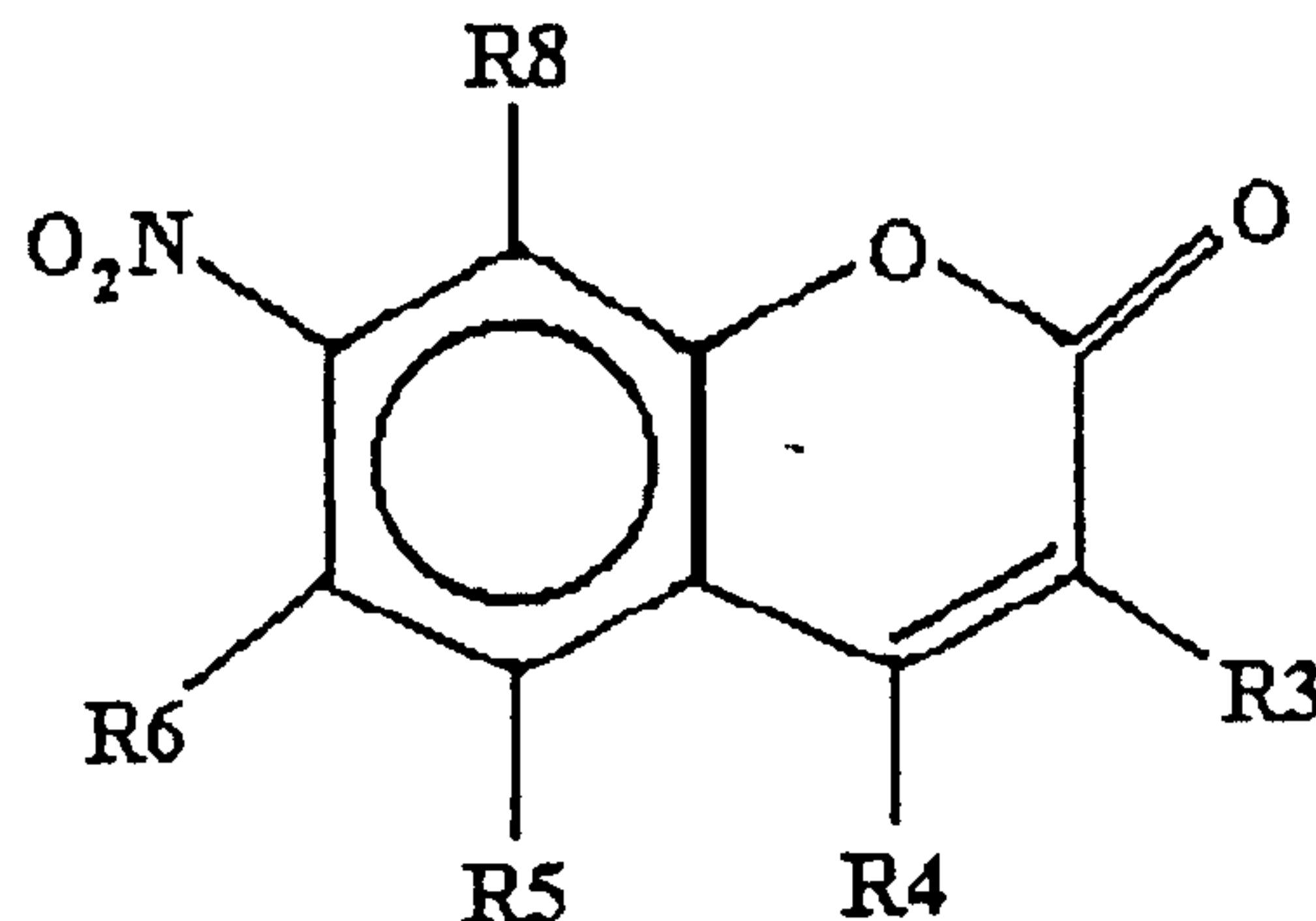
De façon très surprenante, il a été constaté que la très grande majorité des micro-organismes sont capables, grâce à leurs activités nitroréductases, de réduire les dérivés de la 7-nitrocoumarine en composés fluorescents, ce qui n'est pas le cas avec les substrats connus à ce jour. Avec ces dérivés, il existe maintenant une famille d'indicateurs universels permettant la détection de la présence ou de l'absence de micro-organismes dans un échantillon donné.

10

A cet effet, la présente invention concerne un composé de détection de la présence ou de l'absence d'au moins un micro-organisme, caractérisé par le fait que le composé est constitué par une molécule de nitrocoumarine ou un des ses dérivés, qui est fluorescent à l'état réduit.

15 Préférentiellement, ledit composé est constitué par une molécule de 7-nitrocoumarine ou un de ses dérivés.

Le composé a la caractéristique d'être constitué par une molécule ayant la formule générale suivante :



dans laquelle R<sub>3</sub> est choisi parmi : H ou CO<sub>Z</sub>, où Z permet la formation d'une cétone, d'un acide, d'un ester ou de tout autre composé aliphatique, et dans laquelle R<sub>4</sub> est choisi parmi : H ou trifluorométhyle (CF<sub>3</sub>) ou tout composé aliphatique.

5 Selon une variante, R<sub>3</sub> est constitué par : COOCH<sub>3</sub>, COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, COOH, COC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CONC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O ou COCH<sub>3</sub>, et R<sub>4</sub> est constitué par : H ou CH<sub>3</sub>.

Selon une autre variante, le composé est constitué par de l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique.

La concentration en acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique est comprise entre  
10 0,05 et 0,3 mmol/l.

Selon un mode de réalisation intéressant, le composé décrit ci-dessus peut être utilisé dans une composition en combinaison avec au moins une autre molécule de nitrocoumarine ou un des ses dérivés.

L'invention concerne également l'utilisation d'un composé, tel que défini ci-dessus, dans un test de détection et/ou de diagnostic de la présence ou de l'absence de micro-organismes.

L'invention concerne encore un premier procédé de détection d'un micro-organisme ou d'un groupe de micro-organismes dans un échantillon susceptible de les contenir, comprenant les étapes consistant à :

- 20 - ajouter à un milieu de culture, contenant l'échantillon, au moins un composé, à base de nitrocoumarine et préférentiellement de 7-nitrocoumarine ou un de leurs dérivés, et
- rechercher la formation d'un produit fluorescent, la présence ou l'absence de cette fluorescence permet de conclure respectivement à la présence ou à l'absence du micro-organisme ou du groupe de micro-organismes recherché.

L'invention concerne aussi un second procédé d'identification d'au moins un micro-organisme dans un échantillon susceptible de les contenir comprenant les étapes suivantes :

- ajouter dans différents puits d'identification un milieu de culture, contenant chacun une seule source de carbone, telle que lactose, glucose, saccharose... , une fraction de l'échantillon à analyser et au moins un composé, à base de nitrocoumarine et préférentiellement de 7-nitrocoumarine ou un de leurs dérivés, et
- rechercher la formation d'un produit fluorescent, dans chaque puits, la présence ou l'absence de cette fluorescence sur l'ensemble des puits permet d'identifier le micro-organisme. Ce second procédé est également appelé test d'assimilation.

Enfin, l'invention concerne différentes applications associées à la détection de la croissance microbienne à l'aide d'au moins un composé, tel que défini ci-dessus, pour :

- effectuer un contrôle de stérilité,
- effectuer une numération des micro-organismes présents dans l'échantillon,
- déterminer la sensibilité d'un micro-organisme aux agents antimicrobiens, et
- détecter la présence d'au moins un micro-organisme.

Les figures ci-jointes sont données à titre d'exemple explicatif et n'ont aucun caractère limitatif. Elles permettront de mieux comprendre l'invention.

La figure 1 représente un graphique montrant l'effet d'une gamme de nitrocumarines à 0,105 mmol/l sur la croissance d'*E. coli* (NCTC 10418) dans un bouillon Mueller-Hinton.

La figure 2 représente un graphique montrant la fluorescence générée par *E. coli* (NCTC 10418) en présence de différents dérivés de nitrocumarines à 0,105 mmol/l dans un bouillon Mueller-Hinton.

La figure 3 représente un graphique montrant la croissance d'*E. coli* (NCTC 10418) en présence de concentrations variables d'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique dans un bouillon Mueller-Hinton.

La figure 4 représente un graphique montrant la fluorescence générée par *E. coli* (NCTC 10418) en présence de différentes concentrations d'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique dans un bouillon Mueller-Hinton.

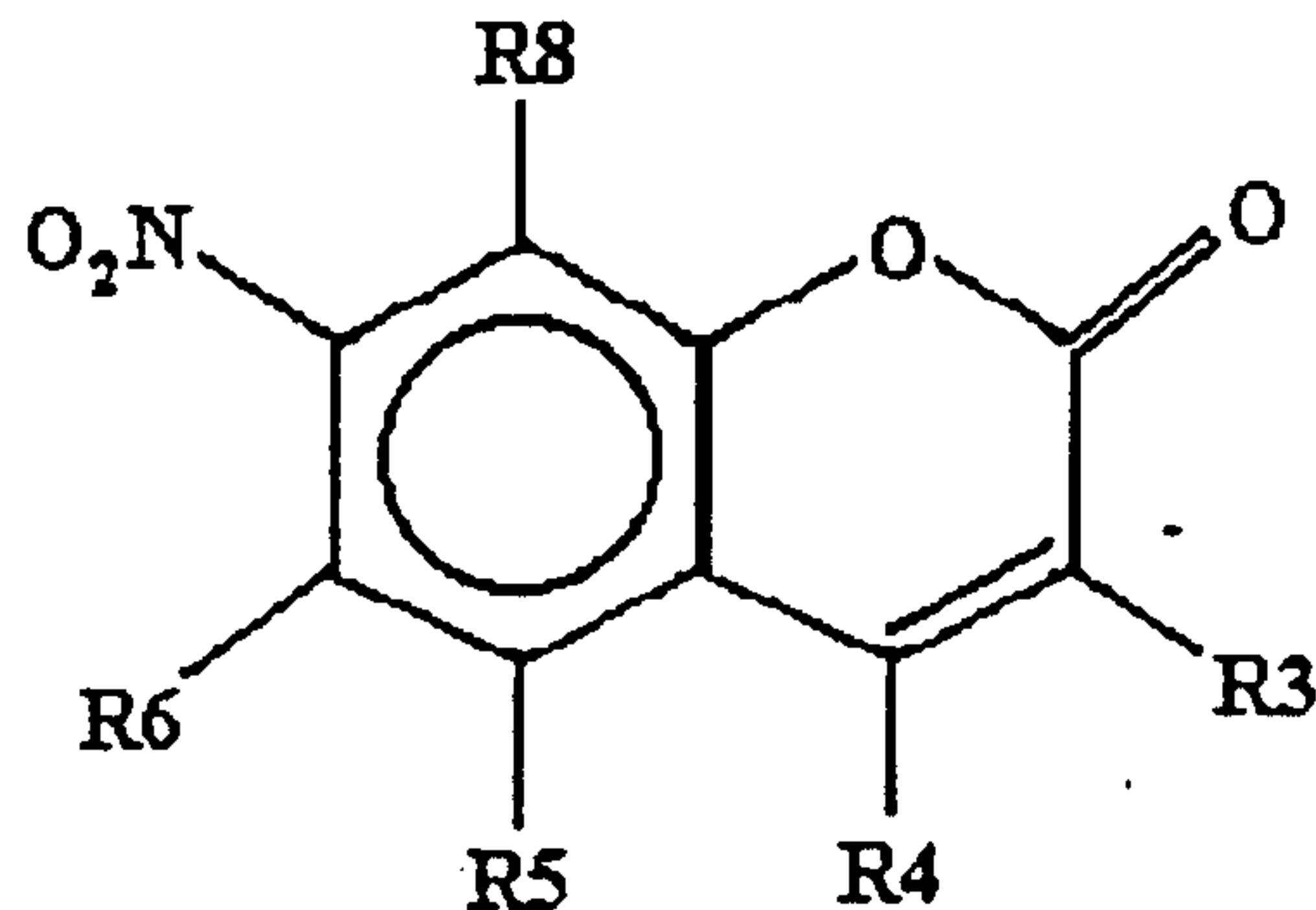
La figure 5 représente un graphique montrant la croissance de différents souches sauvages d'*Enterobacteriaceae* dans un bouillon Mueller-Hinton en présence d'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique à 0,17 mmol/l.

La figure 6 représente un graphique montrant la réduction de l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique à 0,17 mmol/l par les souches sauvages d'*Enterobacteriaceae* de la figure 5.

10

La présente invention concerne une gamme de composés basés sur la 7-nitrocoumarine, qui constitue un substrat fluorogène pour la détection directe des activités nitroaryl-réductases.

La structure générale des nitrocumarines est représentée par la formule II :



15

La liste des dérivés substitués est assez importante. Ainsi les expérimentations ont portées sur chacune des substitutions et sur les différentes possibles. Cette liste est représentée dans le tableau 1 ci-après. Elle concerne essentiellement les radicaux  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$  et  $\text{R}_8$ , qui sont les substituants les plus importants.

20

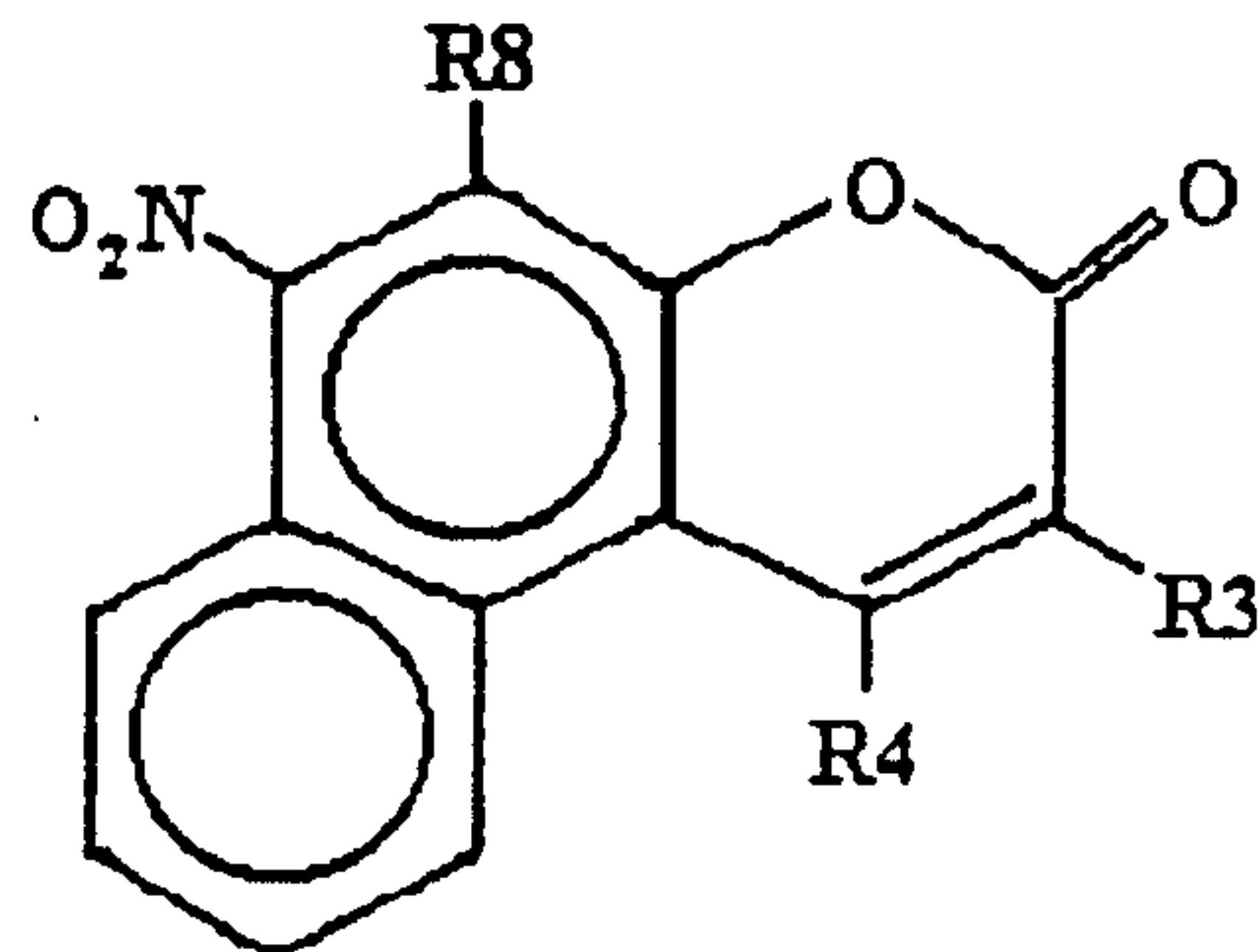
Néanmoins les radicaux  $\text{R}_5$  et  $\text{R}_6$  sont généralement non substitués comme cela est le cas dans le tableau 1. Ils sont alors constitués par des atomes d'hydrogène (H). Pourtant, ils peuvent être différents et être constitués par :

- au moins l'un des radicaux  $\text{R}_5$  et  $\text{R}_6$  est constitué par  $\text{CH}_3$  ou un alkyle de petite taille (nombre d'atomes de carbone inférieur à 5), ou

- au moins l'un des radicaux R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> est constitué par un halogénure (F, Cl, Br, I), ou
- au moins l'un des radicaux R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> est constitué par CH<sub>3</sub>O ou un alkoxy de petite taille (nombre d'atomes de carbone inférieur à 5), ou
- au moins l'un des radicaux R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> est constitué par un phényle (aryle) ou aralkyle.

5 Dans le cas où seul un des radicaux R<sub>5</sub> ou R<sub>6</sub> est l'un des groupements ci-dessus énumérés, l'autre radical est constitué par H.

10 De plus il est possible que R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> forment un cycle aromatique (benzenoïde ou hétérocyclique). La structure d'une telle molécule est décrite ci-contre.



	R3	R4	R8
7-nitrocoumarine	H	H	H
4-méthyl-7-nitrocoumarine	H	CH <sub>3</sub>	H
méthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate	COOCH <sub>3</sub>	H	H
éthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H
acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique	COOH	H	H
3-butyryl-7-nitrocoumarine	COC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H
3-acétyl-4-méthyl-7-nitrocoumarine	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
7-nitrocoumarine-3-carboxymorpholide	CONC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O	H	H

Tableau 1 : Substitutions sur la base des nitrocoumarines et composés obtenus

85466-36

**1°) Matériels :****A - Milieu de croissance :**

Les milieux utilisés sont constitués par des bouillons et géloses Mueller-Hinton et Trypticase Soja, qui ont été obtenus chez Unipath Ltd, Basingstoke, Grande Bretagne.

**B - Substrats et produits chimiques :**

Les substrats suivants ont été synthétisés : 7-nitrocoumarine, 4-méthyl-7-nitrocoumarine, méthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate, éthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate, acide 7-nitrocoumarine 3-carboxylique, 3-butyryl-7-nitrocoumarine, 3-acétyl-4-méthyl-7-nitrocoumarine, 7-nitrocoumarine-3-carboxy-morpholide.

**C - Equipement :**

L'équipement utilisé a été le suivant :

- lecteur spectrophotométrique de plaques de microtitration Anthos 2001<sup>TM</sup>, en provenance de chez Labtech International Limited, Uckfield, Grande Bretagne, et
- lecteur à fluorescence de plaques de microtitration Labtech Biolite F1<sup>TM</sup>, en provenance de chez Labtech International Limited, Uckfield, Grande Bretagne.

**D - Synthèse des nitrocumarines :**

Les produits chimiques impliqués dans la synthèse des nitrocumarines ont tous été obtenus auprès de Aldrich Chemical Company Ltd, Gillingham, Grande-Bretagne.

La synthèse de la 7-nitrocoumarine a été décrite par LIEBERMANN, M, et al. (1951) *Académie des Sciences* 232, 2027-2029. Elle consiste à chauffer à reflux, pendant 3 h, 12 g d'aldéhyde nitro-4-salicylique, 18 g d'acétate de sodium anhydre et 27 g d'anhydride acétique. On coule dans un mortier et on réduit la masse en pâte, puis on essore et on lave avec de petites quantités d'anhydride acétique, et ensuite à

l'eau. Le produit est chauffé 2 h à reflux en présence de 13 g de CO<sub>2</sub>Na<sub>2</sub> et 320 cm<sup>3</sup> d'eau. On filtre à chaud et on précipite également à chaud par l'acide chlorhydrique. On essore après refroidissement et on recristallise dans 300 cm<sup>3</sup> d'acide acétique à 50%. Une nouvelle cristallisation donne un produit fondant à 198-200°C.

La synthèse de différents dérivés de nitrocoumarine nécessite tout d'abord la synthèse de 4-nitrosalicylaldéhyde, qui a été produit en utilisant une modification de la méthode décrite par SEGESER, J.R., et CALVIN, M. (1942) *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 825-826. Ceci implique une acétylation initiale de la 2-méthyl-5-nitrophénol suivie par deux étapes d'ajout de brome, utilisant du N-bromosuccinimide et un catalyseur de peroxyde de benzoyle dans un solvant de tétrachlorure de carbone pour obtenir du 2-acétoxy-4-nitrobenzale bromure. Le dibromure brut est recristallisé à partir de 1-butanol et converti en du nitrosalicylaldéhyde par la procédure suivante.

Un échantillon de 11 grammes (g) de dibromure purifié est dissout dans 50 millilitres (ml) de méthanol sec et l'ensemble est ajouté graduellement à 250 ml d'une solution en ébullition de sodium dans du méthanol (1 % w/v). Après reflux pendant 45 minutes (mn), la solution orange foncée est refroidie et une quantité de 100 ml d'eau est ajoutée. Après ébullition pendant encore 15 mn, la solution est refroidie et son pH est amené à une valeur de 3. Le méthanol est retiré par une évaporation rotative et le précipité de 4-nitrosalicylaldéhyde est séparé par filtration aspirante. Le restant est alors recristallisé dans de l'éthanol dilué.

Trois des dérivés de nitrocoumarine ont été synthétisés par la même méthode qui implique une condensation de Knoevenagel avec du 4-nitrosalicylaldéhyde. Du diméthylmalonate (1,45 g, 11 mM) et 4-nitrosalicylaldéhyde (1,67 g, 10 mM) sont dissous dans 15 ml d'éthanol. Une masse de 100 mg de pipéridine et un volume de 100 µl de d'acide acétique froid sont alors ajoutés et le mélange est reflué pendant 2 h. Le méthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate est formé soit par séparation pendant la réaction soit par cristallisation pendant le refroidissement. Le produit est retiré par filtration aspirante et recristallisé dans de l'éthanol liquide. Pour la synthèse de l'éthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate et du 3-butyryl-7-nitrocoumarine, le diméthyl malonate

est remplacé respectivement soit par du diéthyl malonate, soit par de l'éthylbutyrylacétate.

L'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique est obtenu par reflux de l'éthyl 7-nitrocoumarine-3-carboxylate (2,63 g, 10 mM) avec un excès de solution d'hydroxyde de potassium et d'éthanol aqueux pendant 1 h. La solution de couleur jaune profonde du sel de potassium est alors acidifiée à l'aide d'acide chlorydrique et le produit récolté, lavé avec une petite quantité d'eau, est ensuite recristallisé à partir d'eau en ébullition.

La 7-nitrocoumarine-3-carboxymorpholide est préparée comme suit. L'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique (1,17 g, 5 mM) est dissout dans un mélange de 25 ml de tétrahydrofurane anhydre et de 10 ml de diméthylformamide. A cette solution, préalablement mélangée, est ajouté 5 mmol de N-méthylmorpholine (0,5 g, 5 mM) et, après refroidissement à une température de moins 12 degrés Celsius (° C), est ajouté de l'isobutyle chloroformate (0,68 g, 5 mM). Après 10 mn, le morpholide (0,64 g, 7,5 mM) est ajouté. La réaction peut être réalisée pendant 30 mn, au 0 absolu de température, suivie par une étape de 5 h à la température ambiante. L'hydrochlorure de N-méthylmorpholine est retiré par filtration et le filtrat est versé dans 10 ml d'un mélange eau/glace. Le solide, qui est séparé, est recristallisé dans du méthanol liquide.

La synthèse à la fois du 4-méthyl-7-nitrocoumarine et du 3-acétyl-4-méthyl-7-nitrocoumarine est effectuée par une procédure alternative qui implique l'oxydation de la 7-aminocoumarine. La 7-amino-4-méthylcoumarine (1,75 g, 10 mM) est suspendue dans 10 ml d'acide sulfurique (75 % w/w) et l'ensemble est mélangé efficacement. Une quantité de 2,5 ml de solution de nitrite de sodium (7 M) est ajouté graduellement à moins 5 °C, au moyen d'une longue colonne de refoulement qui atteint le fond du tube de réaction. La solution de diazonium est mélangée pendant 15 mn à moins 2° C jusqu'à atteindre 5 °C. Un échantillon de 5 l d'eau glacée contenant 2,4 g de tétrafluoroborate de sodium est ajouté lentement à la solution de diazonium froid. L'eau glacée est ajoutée lentement à 0 °C jusqu'à ce que le volume forme une masse de cristaux de tétrafluoroborate. Cette substance est retirée par filtration aspirante et les cristaux sont nettoyés avec un peu d'eau glacée, nettoyage qui se poursuit avec du

méthanol et finalement avec de l'éther. Le produit est rapidement séché à l'air sec générant ainsi 2,2 g de produit.

- Une masse de 3 g d'échantillon de poudre de cuivre et une suspension d'oxyde cuivreux (préparé par réduction glucosée de sulfate cuivreux) sont ajoutées à une solution refroidie de nitrite de sodium (4,1 M). Un échantillon de 2,2 g de sel de diazonium est suspendu dans 10 ml d'eau et ajouté en plusieurs aliquotes durant 20 mn à une température comprise entre 5 et 15 °C sous agitation. L'azote est retiré ce qui nécessite l'addition d'une petite quantité d'éther pour prévenir l'apparition de mousse.
- Le mélange se poursuit pendant 5 h. La suspension est filtrée, nettoyée avec de l'eau et ensuite extraite avec de l'acétate d'éthyle chaud. La solution aqueuse est pareillement extraite. Les extraits combinés sont nettoyés avec de l'eau et séchés avec du sulfate de magnésium anhydre. Un solvant est retiré par évaporation rotative pour donner une résidu jaune. La recristallisation à partir d'acide acétique chaud, donne 0,62 g de produit jaune citron, c'est-à-dire de 4-méthyl-7-nitrocoumarine.

La 3-acétyl-4-méthyl-7-nitrocoumarine est préparée par une méthode similaire utilisant le 3-acétyl-4-méthyl-aminocoumarine. Le dernier composé est préparé par une modification de la méthode de synthèse du 7-amino-4-méthylcoumarine, qui consiste en une substitution de l'éthyle diacétoacétate par de l'éthyle acétoacétate.

20

#### **E - Préparation des solutions de substrat :**

- Un échantillon de dérivé de 7-nitrocoumarine est dissout à chaud dans 4 ml d'eau distillée. La quantité dissoute est déterminée de façon à obtenir une concentration finale de 0,105 mmol/l lors de l'essai. Cette solution est ensuite ajoutée à 96 ml de bouillon Mueller-Hinton, et le mélange est filtré de manière stérile.

#### **F - Micro-organismes étudiés :**

Les micro-organismes utilisés sont soit des souches sauvages, soit des souches provenant de collections internationales (NCTC, ATCC)

30

**2°) Méthodes et résultats :**

5       **A - Evaluation de la valeur de différents dérivés de nitrocoumarine comme indicateurs de croissance de souches d'*Escherichia coli* (NCTC 10418) :**

**1°) Méthode :**

Une première étude a été réalisée à l'aide de la souche d' *Escherichia coli* (NCTC 10418) et les huit nitrocumarines décrites structurellement dans le tableau I, 10 pour mémoire, il s'agit de :

- 7-nitrocoumarine,
- 4-méthyl-7-nitrocoumarine,
- méthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate,
- éthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate,
- 15     • acide 7-nitrocoumarine 3-carboxylique,
- 3-butyryl-7-nitrocoumarine,
- 3-acétyl-4-méthyl-7-nitrocoumarine, et
- 7-nitrocoumarine-3-carboxymorpholide.

20       La souche d' *E.coli* est cultivée à 35°C sur gélose Columbia au sang de mouton pendant 24 h. Une suspension est ensuite réalisée dans de l'eau distillée stérile et ajustée au point 0,5 de l'échelle de Mac Farland, soit environ  $10^8$  cellules par millilitre (cellules/ml), puis diluée au centième dans du bouillon Mueller-Hinton stérile, soit environ  $10^6$  (cellules/ml).

25

Cinquante microlitres de chaque solution de nitrocumarines et cinquante microlitres de suspension microbienne sont ajoutés dans les puits d'une plaque de microtitration. Les plaques ainsi préparées sont mises à incuber à 35°C et lues toutes les 30 mn pendant 4 h - en densité optique (690 nm), à l'aide du spectrophotomètre Anthos 30 2001 (Labtech International Limited), et en fluorescence (excitation : 365 nm et

émission : 440 nm), à l'aide du fluorimètre Biolite F1 2001 (Labtech International Limited).

2°) Résultats :

5 La figure 1 montre l'effet de chacune des huit nitrocoumarines (à 0,105 mmol/l) sur la croissance d'*E. coli* (NCTC 10418). On voit clairement sur cette figure que la substitution chimique du noyau coumarine a un effet significatif sur les caractéristiques inhibitrices de la 7-nitrocoumarine. Par exemple, en présence de 0,105 mmol/l d'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique, il n'y a pas de mise en évidence 10 d'inhibition de croissance. Toutefois, en présence de 0,105 mmol/l de méthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate, la D.O. globale est réduite de 92% par comparaison avec le contrôle de croissance. Ces effets inhibiteurs reflètent largement le taux de réduction de substrat tel qu'il a été mesuré par production de fluorescence.

15 On voit clairement sur la figure 2, que les deux composés les plus inhibiteurs, le méthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate et la 3-butyryl-7-nitrocoumarine, sont les moins réduits après la période de quatre heures. De plus, la réduction de l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique, seul composé non inhibiteur, a largement dépassé celle des autres nitrocoumarines et la fluorescence générée est plus de deux fois supérieure à celle produite par n'importe quel autre substrat.

20

Pour faciliter la lecture des figures 1 et 2, les deux tableaux 2 et 3 qui suivent énumèrent les valeurs associées à ces figures.

Composé\Temps(mn)	0	30	60	90	120	150	180	210	240
7-nitrocoumarine	0,000	-0,002	0,000	0,002	0,009	0,025	0,072	0,133	0,211
4-méthyl-7-nitrocoumarine	0,000	0,000	0,002	0,004	0,010	0,024	0,055	0,113	0,175
méthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate	0,000	-0,001	-0,001	0,000	0,000	0,002	0,006	0,014	0,032
éthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate	0,000	-0,005	-0,008	-0,008	-0,006	0,000	0,018	0,046	0,116
acide 7-nitrocoumarine 3-carboxylique	0,000	0,000	0,002	0,008	0,026	0,068	0,164	0,227	0,416
3-butyryl-7-nitrocoumarine	0,000	0,001	0,005	0,007	0,009	0,012	0,015	0,039	0,096
3-acétyl-4-méthyl-7-nitrocoumarine	0,000	-0,003	-0,002	-0,001	0,002	0,008	0,023	0,051	0,110
7-nitrocoumarine-3-carboxymorpholide	0,000	-0,002	-0,001	0,001	0,005	0,014	0,037	0,068	0,109
Contrôle	0,000	-0,002	0,000	0,005	0,019	0,085	0,169	0,246	0,400

Tableau 2 : Valeurs numériques associées à la figure 1

Composé\Temps(min)	0	30	60	90	120	150	180	210	240
7-nitrocoumarine	0	77	519	1447	2915	4713	7160	10182	14189
4-méthyl-7-nitrocoumarine	0	15	302	974	2008	3299	5097	7545	11125
méthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate	0	174	702	1297	2035	2905	3946	5005	6668
éthyl-7-nitrocoumarine-3-carboxylate	0	173	814	1703	2813	4126	5646	7370	10859
acide 7-nitrocoumarine 3-carboxylique	0	-67	4	181	586	1694	6724	17495	31314
3-butyryl-7-nitrocoumarine	0	64	387	894	1538	2344	3329	4642	6845
3-acétyl-4-méthyl-7-nitrocoumarine	0	40	390	992	1804	2811	4090	5576	8017
7-nitrocoumarine-3-carboxymorpholide	0	180	665	1376	2414	3796	5817	8454	12263
Contrôle	0	-214	-159	-205	-174	-177	-131	-104	-101

Tableau 3 : Valeurs numériques associées à la figure 2

5

B - Etude de la valeur de l'acide 7-nitrocoumarine 3-carboxylique à différentes concentrations pour le contrôle de la croissance de la souche d'*Escherichia coli* (NCTC 10418) :

10

1°) Méthode :

L'influence de la concentration en acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique sur la sensibilité de la détection de la souche d'*E.coli* NCTC 10418 a été étudiée en faisant

varier la gamme de concentration de l'indicateur de 0 à 0,262 mmol/l. Les autres conditions de l'essai étaient les mêmes que celles décrites dans le paragraphe A précédent.

**2°) Résultats :**

5 On voit clairement sur la figure 3 que la concentration d'acide 7-nitrocoumarine 3-carboxylique n'a pas d'effet significatif sur la croissance d'*E. coli* comme l'indique la superposition des cinétiques obtenues avec les différentes concentrations en substrat et ce même par rapport au contrôle. Le fait que ce composé ne soit pas du tout inhibiteur, est reflété par le taux de fluorescence généré par la nitro-réduction.

10 La figure 4 montre que la production de fluorescence augmente avec la concentration de substrat jusqu'à saturation du substrat autour de 0,157 mmol/l (36,9 µg/ml). Au-delà de cette concentration, la sensibilité de la réaction fluorescente n'est plus augmentée.

Pour faciliter la lecture des figures 3 et 4, les deux tableaux 4 et 5 qui suivent 15 énumèrent les valeurs associées à ces figures.

Composé\Temps(mn)	0	30	60	90	120	150	180	210	240
0,262 mmol/l	0,000	0,000	0,002	0,009	0,027	0,069	0,144	0,213	0,346
0,210 mmol/l	0,000	0,000	0,003	0,010	0,027	0,072	0,138	0,187	0,346
0,157 mmol/l	0,000	-0,001	0,002	0,009	0,027	0,073	0,151	0,205	0,372
0,105 mmol/l	0,000	0,000	0,002	0,008	0,026	0,068	0,164	0,227	0,416
0,052 mmol/l	0,000	0,001	0,003	0,011	0,031	0,082	0,153	0,225	0,408
0,026 mmol/l	0,000	0,001	0,004	0,011	0,032	0,079	0,201	0,290	0,436
0,013 mmol/l	0,000	0,000	0,003	0,011	0,032	0,088	0,149	0,233	0,371
0,005 mmol/l	0,000	0,000	0,003	0,011	0,034	0,090	0,155	0,246	0,411
Contrôle	0,000	0,002	0,005	0,011	0,025	0,061	0,174	0,241	0,332

**Tableau 4 : Valeurs numériques associées à la figure 3**

Composé\Temps(mn)	0	30	60	90	120	150	180	210	240
0,262 mmol/l	0	3	131	446	1190	3037	9721	22066	37949
0,210 mmol/l	0	-6	88	354	979	2588	9000	21589	37823
0,157 mmol/l	0	-74	48	280	811	2231	8264	21022	36517
0,105 mmol/l	0	-67	4	181	586	1694	6724	17495	31314
0,052 mmol/l	0	-83	-76	33	241	861	4004	10584	19530
0,026 mmol/l	0	-91	-110	-39	71	467	2311	6028	11387
0,013 mmol/l	0	-113	-141	-76	-22	174	1068	3073	5902
0,005 mmol/l	0	-134	-164	-122	-94	-9	406	1307	2466
Contrôle	0	-296	-159	-168	-149	-156	-131	-110	-119

Tableau 5 : Valeurs numériques associées à la figure 4

5

**C - Etude de la valeur de l'acide 7-nitrocoumarine 3-carboxylique comme indicateur de croissance de différentes souches d'entérobactéries :**

10

**1°) Méthode :**

Dans cette expérience, il a été vérifié s'il était possible de détecter d'autres souches d'entérobactéries que celle d'*E. coli* à l'aide de l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique. Les conditions de cette étude étaient similaires à celles de la première expérience (paragraphe A).

15

Cinq souches sauvages appartenant aux espèces *Citrobacter diversus*, *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii* et *Shigella sonnei* ont été testées

**2°) Résultats :**

La figure 6 montre la réduction de l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique par des souches sauvages appartenant à cinq espèces différentes d'entérobactéries. Toutes les souches testées ont été capables de réduire ce composé. Une comparaison des cinétiques de fluorescence de la figure 6 avec les cinétiques de croissance de la figure 5 montre une excellente corrélation entre croissance et fluorescence, indiquant ainsi que l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique est un très bon indicateur de croissance.

Pour faciliter la lecture des figures 5 et 6, les deux tableaux 6 et 7 qui suivent énumèrent les valeurs associées à ces figures.

10

Composé\Temps(mn)	0	30	60	90	120	150	180	210	240
<i>C. diversus</i>	0,000	0,000	0,005	0,011	0,020	0,050	0,092	0,143	0,250
<i>E. agglomerans</i>	0,000	-0,002	0,002	0,006	0,027	0,057	0,155	0,225	0,323
<i>H. alvei</i>	0,000	-0,001	0,004	0,009	0,016	0,034	0,092	0,149	0,246
<i>M. morganii</i>	0,000	-0,010	-0,010	-0,005	0,003	0,020	0,064	0,116	0,187
<i>S. sonnei</i>	0,000	-0,001	0,000	0,002	0,013	0,042	0,097	0,159	0,246
Contrôle	0,000	-0,0002	-0,002	0,003	-0,002	0,005	-0,003	-0,001	0,003

**Tableau 6 : Valeurs numériques associées à la figure 5**

Composé\Temps(mn)	0	30	60	90	120	150	180	210	240
<i>C. diversus</i>	0	3	3	34	92	281	546	1209	5393
<i>E. agglomerans</i>	0	-15	-3	9	74	199	501	1246	4099
<i>H. alvei</i>	0	-24	-30	0	40	122	260	775	2048
<i>M. morganii</i>	0	-42	-24	-15	31	95	403	2170	8128
<i>S. sonnei</i>	0	-9	15	52	162	434	1108	3095	8567
Contrôle	0	9	0	24	21	34	43	24	61

**Tableau 7 : Valeurs numériques associées à la figure 6**

Bien que les résultats ne soient pas présentés ici, il a été vérifié que l'on obtenait le même genre de cinétiques avec la plupart des micro-organismes, autres que les entérobactéries, par exemple les bacilles à Gram négatif non fermentants, les 5 staphylocoques, les streptocoques, les *Listeria* et les levures. Tous étaient capables de réduire les dérivés nitrocumariniques, en particulier l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique, pour donner un signal fluorescent, montrant l'universalité de cette méthode de détection de la croissance, comme cela est illustré par les résultats de l'étude suivante.

10

**D- Etude de la valeur de l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique comme indicateur de croissance pour une large variétés de micro-organismes :**

15

**1°) Méthode :**

Cette étude a été réalisée en utilisant l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique et en testant seize (16) souches de micro-organismes, représentant une large variété de bactéries et incluant une levure. La liste des souches étudiées est énumérée dans le tableau 8 défini ci-après.

20

Un échantillon de 10 mg de l'indicateur est dissout à chaud dans 4 ml d'eau distillée. Cette solution est ensuite ajoutée à 96 ml de bouillon Trypticase-Soja, et le mélange est filtré de manière stérile.

25

Les souches sont cultivées à 35°C en bouillon Trypticase-Soja pendant 24 h. Chaque culture est alors diluée au 1/1000 dans du bouillon Trypticase-Soja, puis des dilutions successives au 1/10 sont effectuées jusqu'à ne plus avoir de cellules microbiennes dans la prise d'essai.

On réalise ainsi une gamme de dilutions allant de  $10^{-3}$  à  $10^{-13}$ .

Cinquante microlitres de chaque dilution et cinquante microlitres de solution de bouillon Trypticase-Soja, avec ou sans acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique, sont ajoutés dans les puits d'une plaque de microtitration.

Les plaques ainsi préparées sont mises à incuber à 35°C et lues, d'une part, à instant de départ (T zéro) et, d'autre part, après 24 h :

- en densité optique (690 nm), à l'aide du spectrophotomètre Anthos 2001 (Labtech International Limited), pour les puits ne contenant pas l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique, et

- en fluorescence (excitation : 365 nm et émission : 440 nm), à l'aide du fluorimètre Biolite F1 2001 (Labtech International Limited), pour les puits contenant l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique.

Afin de vérifier la correspondance entre croissance et fluorescence, ainsi que l'absence de toxicité de l'indicateur, tous les puits ont été repiqués sur gélose Columbia au sang de mouton.

## 2°) Résultats :

L'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique a été utilisé pour tester seize souches de micro-organismes, représentant une large variété de bactéries et incluant une levure, comme cela est bien indiqué dans le tableau 8 ci-dessous.

Les mesures de fluorescence (première ligne pour chaque souche) et de densité optique (deuxième ligne pour chaque souche) obtenues après 24 h d'incubation sont notées dans le tableau 8. Afin de vérifier la correspondance entre croissance et fluorescence, ainsi que l'absence de toxicité de l'indicateur, tous les puits ont été repiqués sur gélose Columbia au sang de mouton, et ceux qui ont donné des colonies ont été indiqués dans le tableau par des cases en italiques.

Les résultats présentés dans le tableau montrent qu'il existe une très grande corrélation entre la fluorescence due à la réduction de l'indicateur et la croissance microbienne, et cela quel que soit le type de micro-organisme. Les rares différences mineures observées peuvent s'expliquer par de faibles variations possibles au niveau du nombre de cellules vivantes présentes dans les puits des plaques de microtitration, notamment pour les dilutions limites pour lesquelles l'inoculum peut contenir une seule cellule microbienne. La détection de la fluorescence peut donc se substituer à la mise en évidence de la croissance. L'utilisation de l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique

comme indicateur fluorescent de croissance apparaît extrêmement sensible puisqu'il est possible de détecter un très petit nombre de micro-organismes, qui peut être estimé à une seule cellule vivante, lorsque l'on utilise la méthode des dilutions limites pratiquée lors de cette expérimentation.

Il est à noter que dans cet essai, la souche de levure testée (*Candida albicans*) a généré un faible niveau de fluorescence, comparativement aux bactéries. Cela est dû en fait à l'utilisation du bouillon Tryptcase-Soja qui n'est pas un milieu bien adapté à la croissance des levures. Bien que les résultats ne soient pas présentés, si le milieu Tryptcase-Soja est remplacé par un bouillon RPMI recommandé pour les levures, le niveau de fluorescence obtenu est alors comparable à celui observé avec les bactéries.

Les résultats sont présentés sur le tableau 8 ci-après. Le nombre de dilutions étant important (onze dilutions entre  $10^{-3}$  et  $10^{-13}$  plus une douzième valeur concernant un « blanc » faisant office de témoin), et afin de faciliter la compréhension et la lecture de ce tableau, celui-ci a été divisé en deux parties. Une première partie concerne les dilutions comprises entre  $10^{-3}$  et  $10^{-9}$ . Une seconde partie concerne les dilutions comprises entre  $10^{-10}$  et  $10^{-13}$  et le témoin.

Facteur de dilution des suspensions	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$
<i>Acinetobacter baumanii</i> (ATCC 19606)	27016	11695	12525	8912	6953	1651	1705
<i>Acinetobacter baumanii</i> (ATCC 19606)	0.447	0.307	0.240	0.085	0.071	0.017	0.002
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (ATCC 7844)	29657	18288	12311	12223	11635	14858	13353
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (ATCC 7844)	0.522	0.714	0.669	0.565	0.290	0.404	0.208
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (ATCC 17906)	19231	17403	12614	9727	4236	1981	1938
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (ATCC 17906)	0.063	0.055	0.061	0.047	0.016	-0.003	-0.001
<i>Brevundimonas vesicularis</i> (ATCC 11426)	2543	1962	1861	1941	1928	1889	1929
<i>Brevundimonas vesicularis</i> (ATCC 11426)	0.112	0.037	0.006	-0.012	-0.001	0.005	-0.002
<i>Burkholderia cepacia</i> (ATCC 25416)	16978	16719	16808	15800	11973	1969	1996
<i>Burkholderia cepacia</i> (ATCC 25416)	0.594	0.637	0.536	0.602	0.571	-0.001	0.000
<i>Listeria ivanovii</i> (wild strain)	16246	44910	13185	44865	9251	8137	44425
<i>Listeria ivanovii</i> (wild strain)	0.312	0.269	0.384	0.295	0.298	0.178	0.001
<i>Moraxella nonliquefaciens</i> (ATCC 19975)	28160	27889	28439	27648	27385	27196	1974
<i>Moraxella nonliquefaciens</i> (ATCC 19975)	0.828	0.693	0.666	0.693	0.708	0.697	0.000
<i>Moraxella osloensis</i> (ATCC 19976)	11426	9949	7700	5875	1925	1941	1977
<i>Moraxella osloensis</i> (ATCC 19976)	0.056	0.044	0.051	0.059	0.000	0.001	0.000
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (ATCC 13525)	8985	1774	1657	1625	1716	1690	1736
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (ATCC 13525)	0.005	-0.002	-0.002	-0.004	-0.001	-0.003	-0.002
<i>Pseudomonas putida</i> (ATCC 12633)	12589	9810	7670	6806	5714	1715	1664
<i>Pseudomonas putida</i> (ATCC 12633)	0.567	0.483	0.431	0.465	0.483	-0.002	0.000

Facteur de dilution des suspensions	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$
<i>Serratia marcescens</i> (NCTC 10211)	47178	49470	45804	45454	45637	43088	48320
<i>Serratia marcescens</i> (NCTC 10211)	0.543	1.001	0.464	0.487	1.240	0.549	1.051
<i>Shewanella putrefaciens</i> (ATCC 8071)	40277	37262	34890	32034	31793	1911	1902
<i>Shewanella putrefaciens</i> (ATCC 8071)	0.364	0.267	0.139	0.106	0.108	-0.003	-0.001
<i>Shigella sonnei</i> (NCTC 8586)	51755	50254	50166	50278	49882	47370	1816
<i>Shigella sonnei</i> (NCTC 8586)	0.183	0.209	0.207	0.269	0.215	0.050	0.000
<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 6571)	46607	45207	44544	43559	41437	1678	1666
<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 6571)	0.507	0.484	0.497	0.507	0.444	-0.003	-0.001
<i>Streptococcus mitis</i> (NCTC 12261)	20988	21541	19899	19619	17228	1682	1676
<i>Streptococcus mitis</i> (NCTC 12261)	0.209	0.367	0.325	0.300	0.257	-0.002	0.000
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	2847	2609	2335	2041	1693	1745	1693
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	0.49	0.419	0.308	0.403	-0.003	0.001	0.000
Contrôle sans microorganisme	1785	1727	1779	1755	1786	1724	1712
Contrôle sans microorganisme	0.003	0.001	0.000	-0.003	-0.005	-0.002	-0.001

Facteur de dilution des suspensions	$10^{-10}$	$10^{-11}$	$10^{-12}$	$10^{-13}$	"blanc"
<i>Acinetobacter baumanii</i> (ATCC 19606)	1718	1678	1687	1660	1671
<i>Acinetobacter baumanii</i> (ATCC 19606)	-0.001	0.000	-0.001	0.002	0.000
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (ATCC 7844)	10862	1712	1654	1699	1704
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (ATCC 7844)	0.200	-0.001	-0.001	-0.001	0.000
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (ATCC 17906)	2005	1947	1904	1938	1907
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (ATCC 17906)	-0.002	0.000	-0.001	-0.002	-0.001
<i>Brevundimonas vesicularis</i> (ATCC 11426)	1910	1938	1919	1877	1840
<i>Brevundimonas vesicularis</i> (ATCC 11426)	0.000	-0.001	-0.001	-0.003	0.006
<i>Burkholderia cepacia</i> (ATCC 25416)	1950	1925	1965	1914	1874
<i>Burkholderia cepacia</i> (ATCC 25416)	-0.002	0.002	-0.002	-0.002	-0.001
<i>Listeria ivanovii</i> (wild strain)	1663	1651	1691	1682	1680
<i>Listeria ivanovii</i> (wild strain)	-0.001	0.000	0.000	0.000	-0.001
<i>Moraxella nonliquefaciens</i> (ATCC 19975)	2057	2002	1956	1907	1969
<i>Moraxella nonliquefaciens</i> (ATCC 19975)	-0.002	0.000	-0.001	0.001	0.000
<i>Moraxella osloensis</i> (ATCC 19976)	2039	1938	1907	1945	1880
<i>Moraxella osloensis</i> (ATCC 19976)	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (ATCC 13525)	1666	1691	1666	1624	1596
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (ATCC 13525)	-0.004	-0.002	0.000	-0.002	0.000
<i>Pseudomonas putida</i> (ATCC 12633)	1660	1651	1660	1657	1648
<i>Pseudomonas putida</i> (ATCC 12633)	-0.002	0.001	0.001	0.001	0.001
<i>Serratia marcescens</i> (NCTC 10211)	1678	1641	1636	1621	1630
<i>Serratia marcescens</i> (NCTC 10211)	-0.002	-0.001	0.001	-0.001	-0.001
<i>Shewanella putrefaciens</i> (ATCC 8071)	1972	1917	1935	1990	1905

Facteur de dilution des suspensions	$10^{-10}$	$10^{-11}$	$10^{-12}$	$10^{-13}$	"blanc"
<i>Shewanella putrefaciens</i> (ATCC 8071)	-0.002	0.001	-0.001	-0.002	0.000
<i>Shigella sonnei</i> (NCTC 8586)	1990	1960	1956	1911	1778
<i>Shigella sonnei</i> (NCTC 8586)	-0.003	0.003	-0.001	-0.004	0.000
<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 6571)	1666	1620	1706	1669	1746
<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 6571)	-0.001	-0.001	0.003	0.000	0.000
<i>Streptococcus mitis</i> (NCTC 12261)	1691	1636	1644	1669	1682
<i>Streptococcus mitis</i> (NCTC 12261)	-0.002	0.001	-0.003	-0.003	-0.003
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	1751	1666	1702	1666	1672
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	-0.005	-0.002	0.005	0.000	0.000
Contrôle sans microorganisme	1730	1734	1700	1639	1734
Contrôle sans microorganisme	-0.001	-0.001	0.001	-0.001	-0.001

Tableau 8 : Comparaison après 24 h en présence d'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique des mesures de fluorescence (1<sup>ère</sup> ligne) et de densité optique (2<sup>ème</sup> ligne) pour des dilutions successives des suspensions de différents micro-organismes

5

### 3°) Conclusion :

Les dérivés de la 7-nitrocoumarine, et notamment l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique, constituent une famille d'indicateurs fluorescents universels de la croissance des micro-organismes.

Les applications de ces nouveaux indicateurs sont nombreuses en microbiologie et concernent toutes les méthodes faisant appel à la détection de la croissance microbienne. Parmi ces applications, on peut citer :

- les méthodes d'antibiogramme et d'antifongigramme (recherche de la sensibilité des micro-organismes aux antibiotiques et antifongiques),
- les méthodes d'identification faisant appel à des tests d'assimilation (mise en évidence de la croissance en présence de substrats utilisés comme seules sources de carbone),
- la mise en évidence de la stérilité d'un échantillon (absence de micro-organismes),
- toute détection de la présence de micro-organismes dans des échantillons susceptibles de les contenir, qu'ils soient cliniques, industriels (alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques...) ou de l'environnement, et

WO 00/28073

PCT/FR99/02704

25

- tout dénombrement de micro-organismes dans un échantillon, en particulier les numérations basées sur la détermination de nombre le plus probable (NPP), bien connue dans le domaine de l'agro-alimentaire.

5

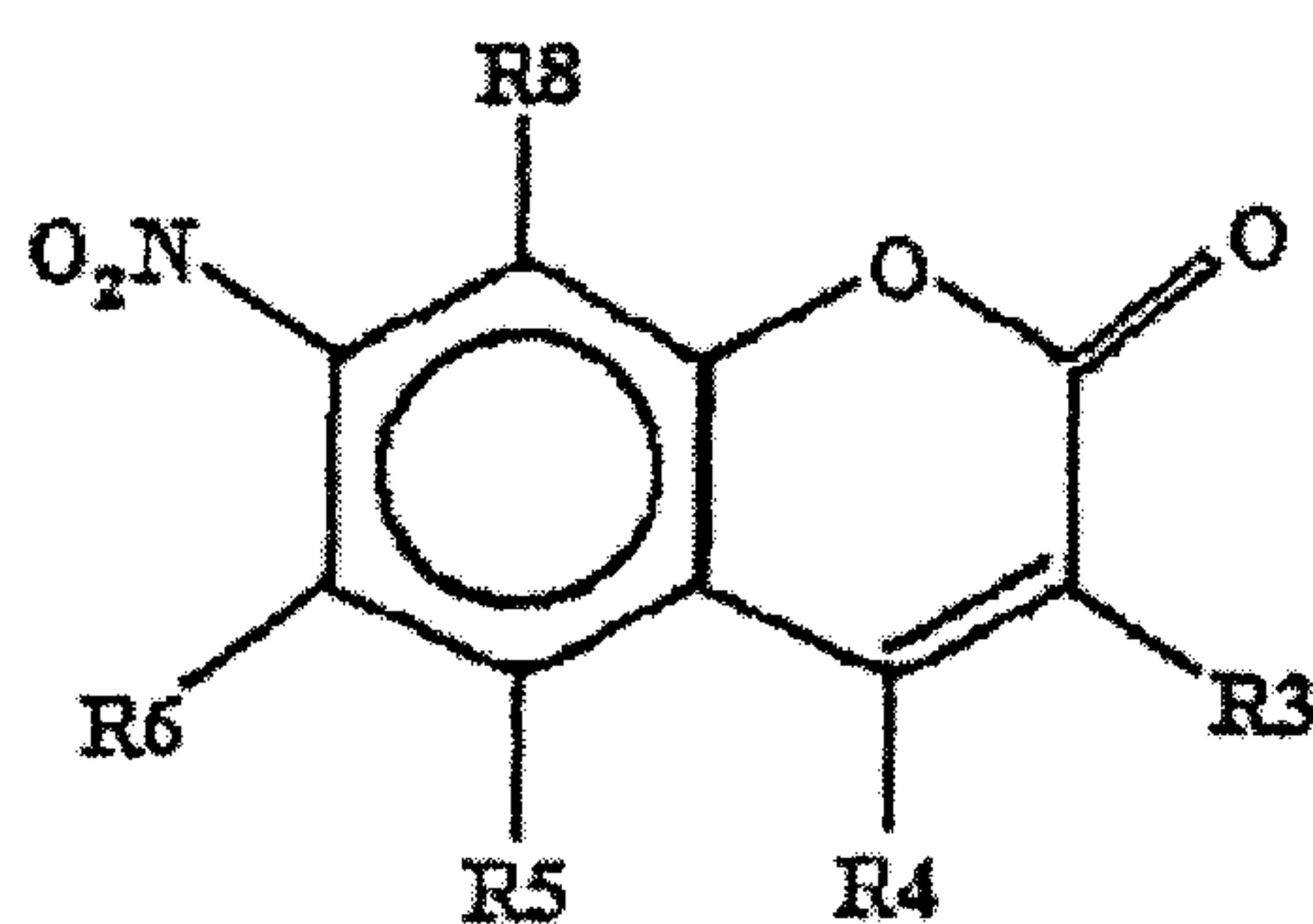
85466-36

26

## REVENDICATIONS:

1. Utilisation d'un composé dans un test de détection ou dans un test de diagnostic ou les deux de la présence ou de l'absence de micro-organismes présentant une activité enzymatique de type nitro-réductase, dans laquelle le 5 composé est constitué par une molécule de 7-nitrocoumarine ou un de ses dérivés.

2. Utilisation, selon la revendication 1, dans laquelle le composé est constitué par une molécule ayant la formule générale suivante :



dans laquelle R<sub>3</sub> est H ou COZ, où Z permet la formation d'une cétone, d'un acide, 10 d'un ester ou de tout autre composé aliphatique;

dans laquelle R<sub>4</sub> est H ou trifluorométhyle (CF<sub>3</sub>) ou tout composé aliphatique;

dans laquelle R<sub>5</sub> est H, un halogénure, un alkyle C<sub>1-4</sub>, un alkoxy C<sub>1-4</sub>, phényle ou un aralkyle;

dans laquelle R<sub>6</sub> est H, un halogénure, un alkyle C<sub>1-4</sub>, un alkoxy C<sub>1-4</sub>, un phényle ou un 15 aralkyle;

ou R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> forment un cycle aromatique; et

R<sub>8</sub> est H.

3. Utilisation selon la revendication 2, dans laquelle R<sub>3</sub> est constitué par COOCH<sub>3</sub>, COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, COOH, COC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, CONC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O ou COCH<sub>3</sub>, et R<sub>4</sub> est constitué par 20 H ou CH<sub>3</sub>.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle le composé est constitué par l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique.

85466-36

27

5. Utilisation selon la revendication 4, dans laquelle la concentration en acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique est comprise entre 0,05 et 0,3 mmol/l.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour permettre la détection de la croissance microbienne afin d'effectuer un contrôle de 5 stérilité.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour permettre la détection de la croissance microbienne afin d'effectuer une numération des micro-organismes présents dans un échantillon à analyser.

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour 10 permettre la détection de la croissance microbienne afin de déterminer la sensibilité d'un micro-organisme aux agents antimicrobiens.

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour permettre la détection de la croissance microbienne afin de détecter la présence d'au moins un micro-organisme.

15 10. Procédé de détection d'un micro-organisme présentant une activité enzymatique de type nitro-réductase ou d'un groupe de micro-organismes présentant une activité enzymatique de type nitro-réductase dans un échantillon à analyser, comprenant les étapes consistant à :

- ajouter à un milieu de culture, contenant l'échantillon, au moins un composé, à base 20 de 7-nitrocoumarine ou un de ses dérivés, et

- rechercher la formation d'un produit fluorescent, la présence ou l'absence de cette fluorescence permettant de conclure respectivement à la présence ou à l'absence du micro-organisme ou du groupe de micro-organismes recherché.

25 11. Procédé d'identification d'au moins un micro-organisme présentant une activité enzymatique de type nitro-réductase dans un échantillon à analyser comprenant les étapes suivantes :

85466-36

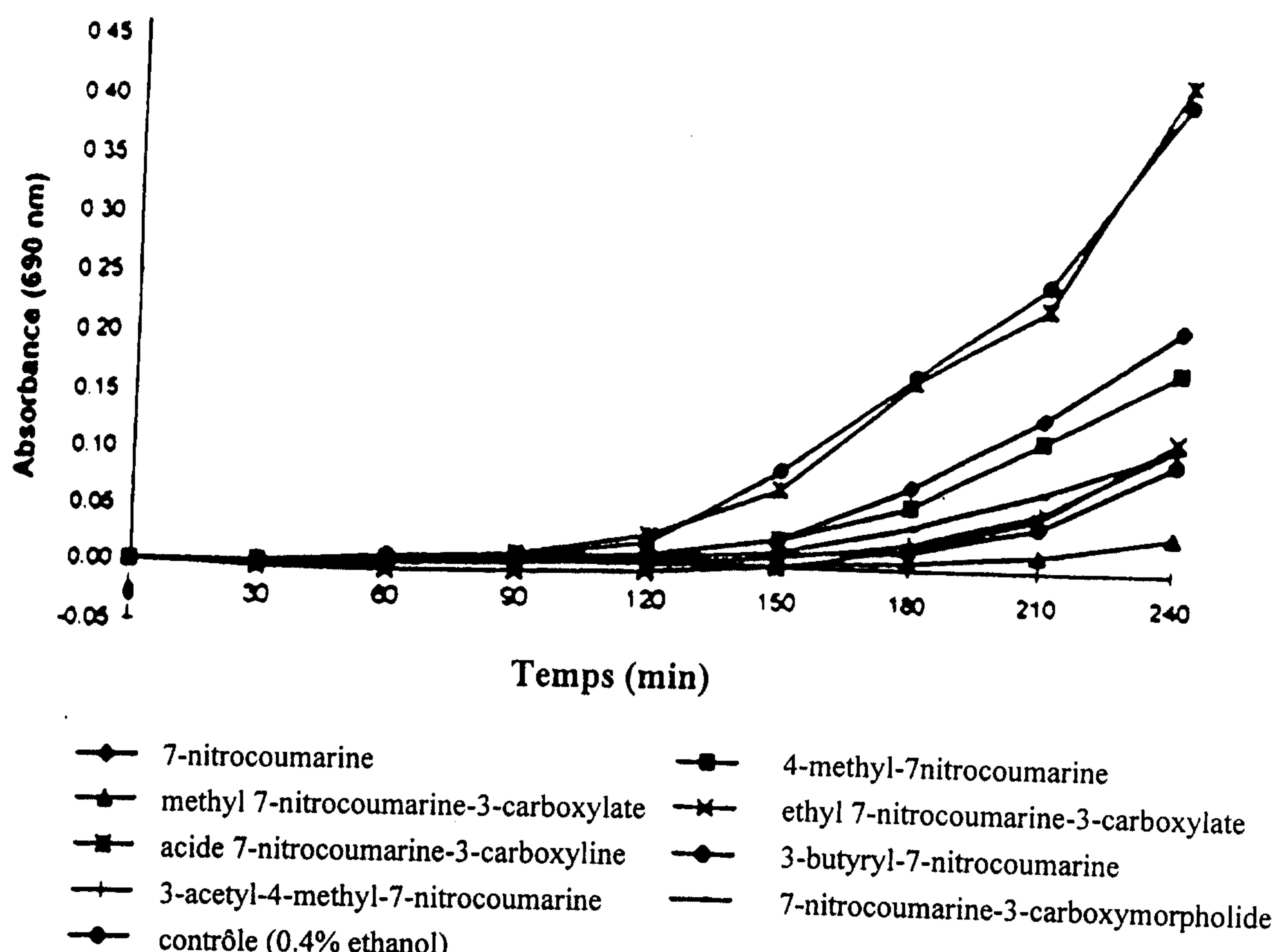
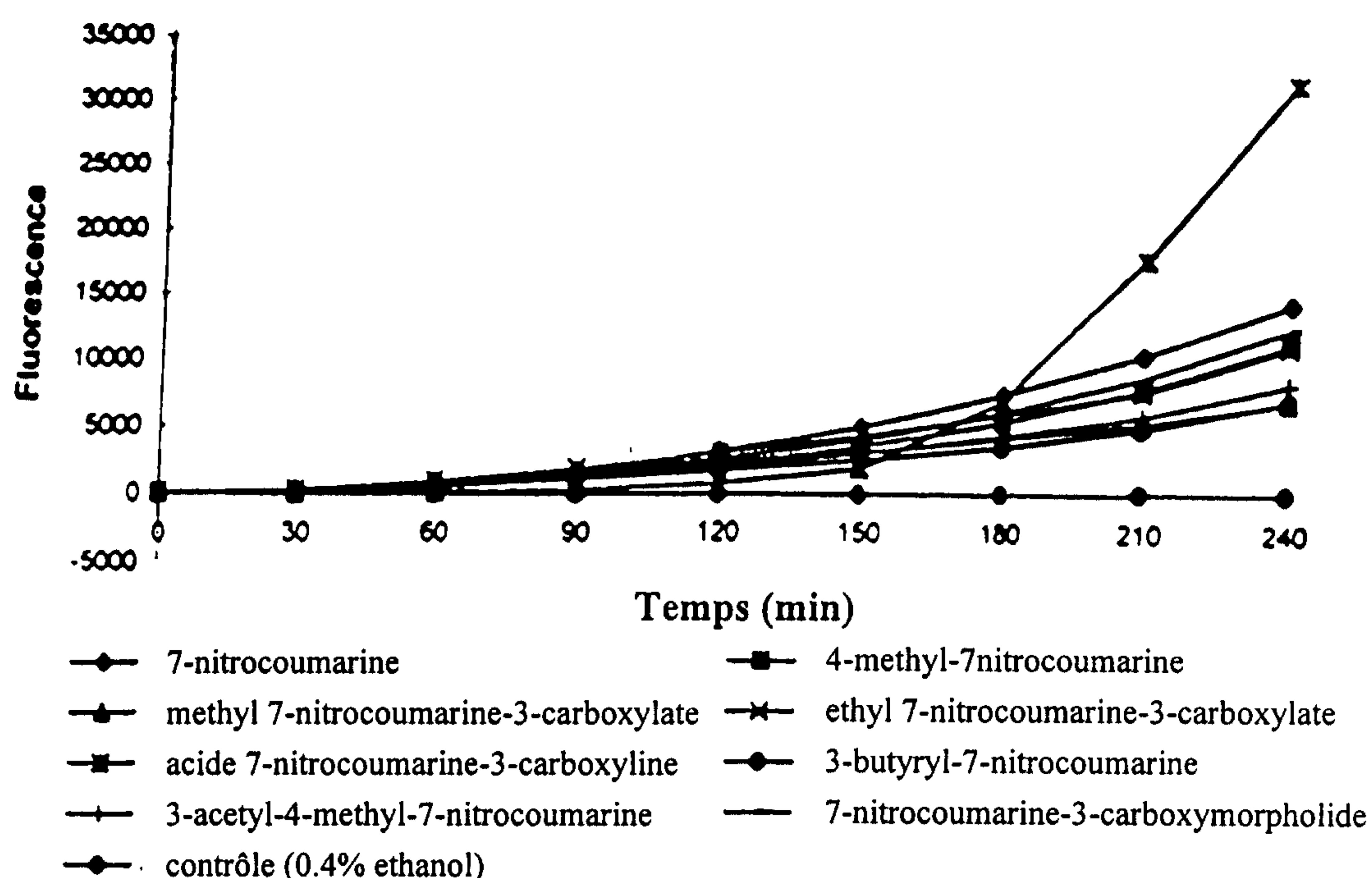
28

- ajouter dans différents puits d'identification un milieu de culture, contenant chacun une seule source de carbone, une fraction de l'échantillon à analyser et au moins un composé, à base de 7-nitrocoumarine ou un de ses dérivés, et
- rechercher la formation d'un produit fluorescent, dans chaque puits, la présence ou 5 l'absence de cette fluorescence sur l'ensemble des puits permet d'identifier le micro-organisme.

SMART & BIGGAR  
AGENTS DE BREVETS

MONTRÉAL, CANADA

1 / 3

Fig. 1Fig. 2

2 / 3

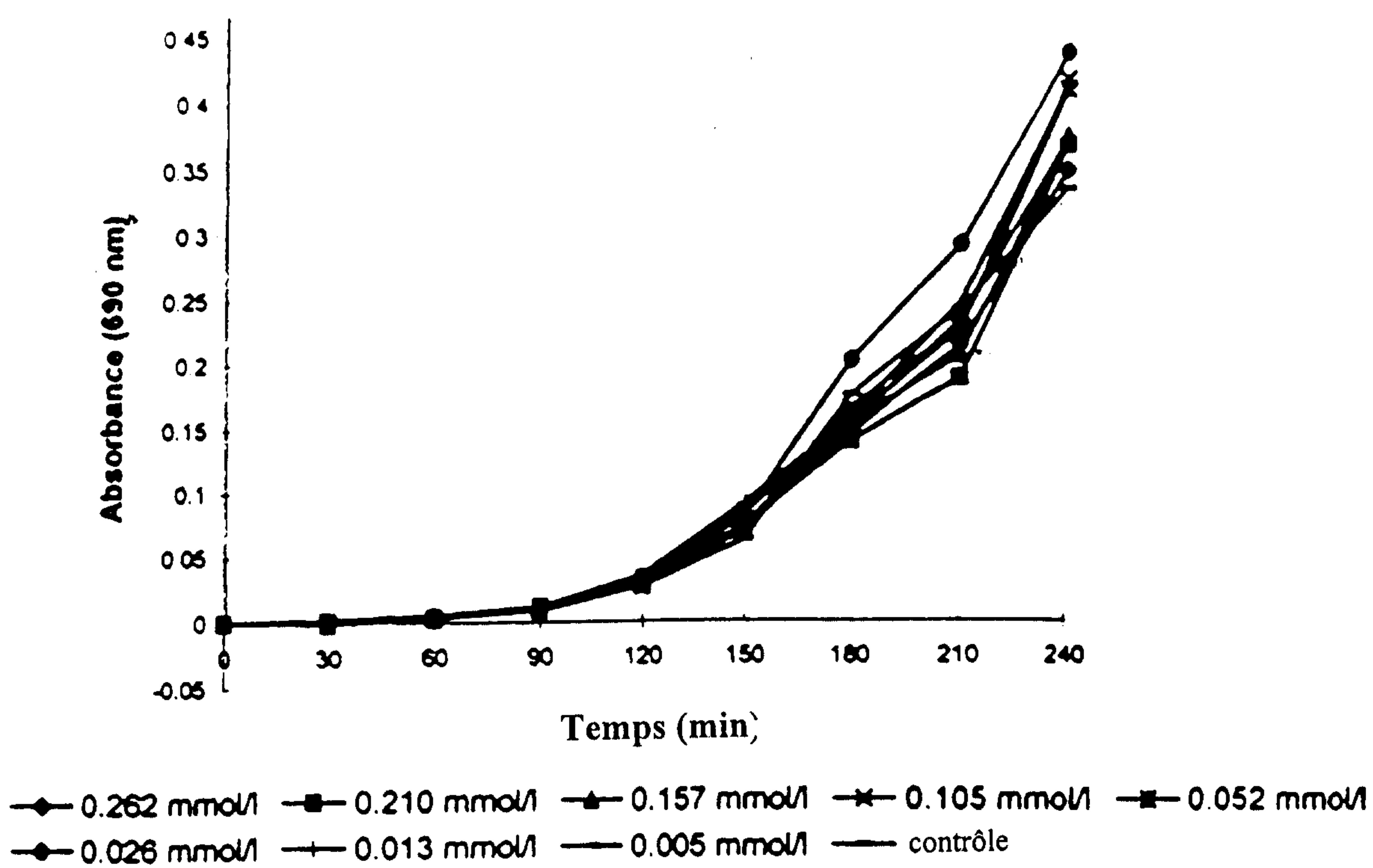


Fig. 3

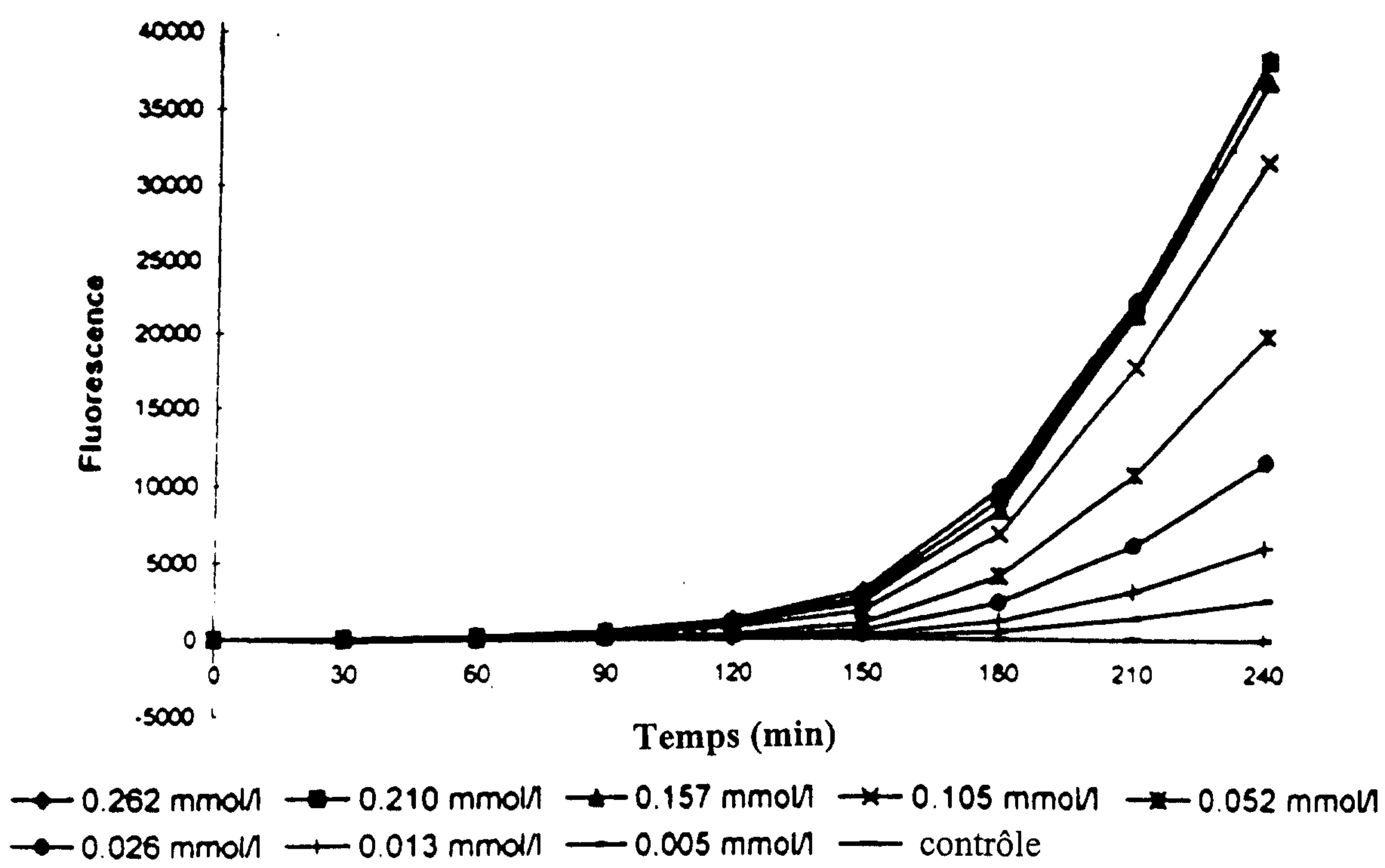


Fig. 4

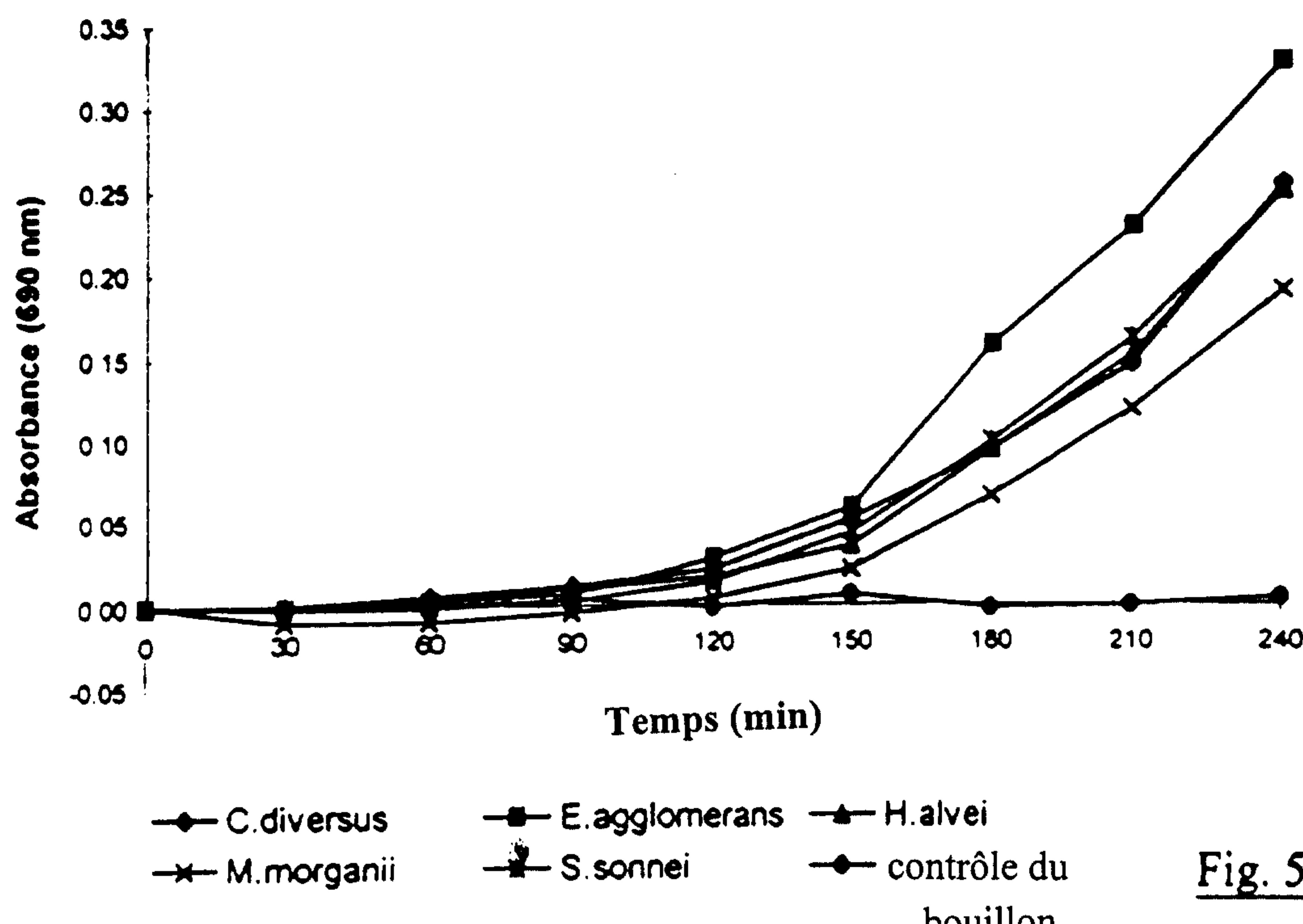


Fig. 5

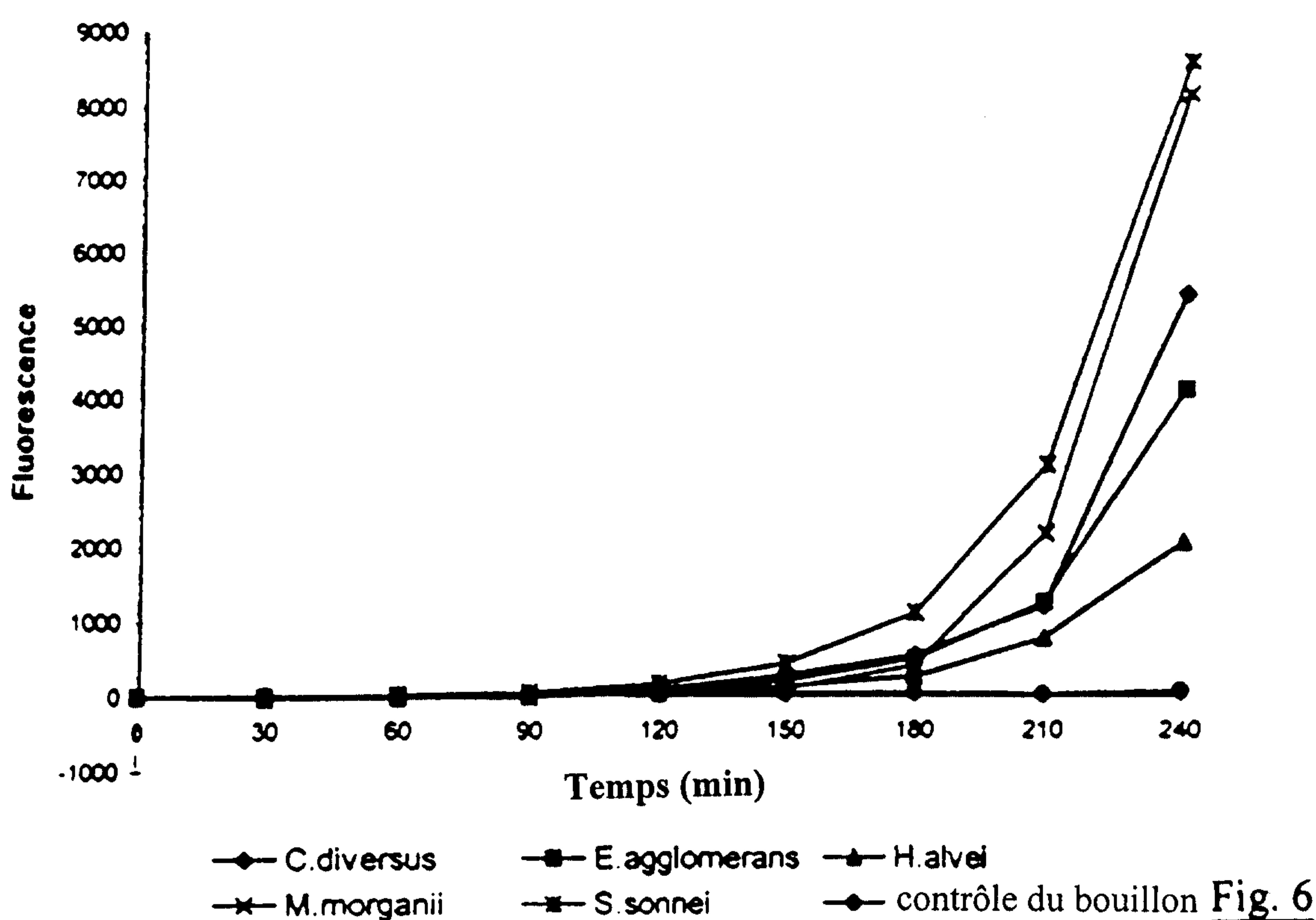
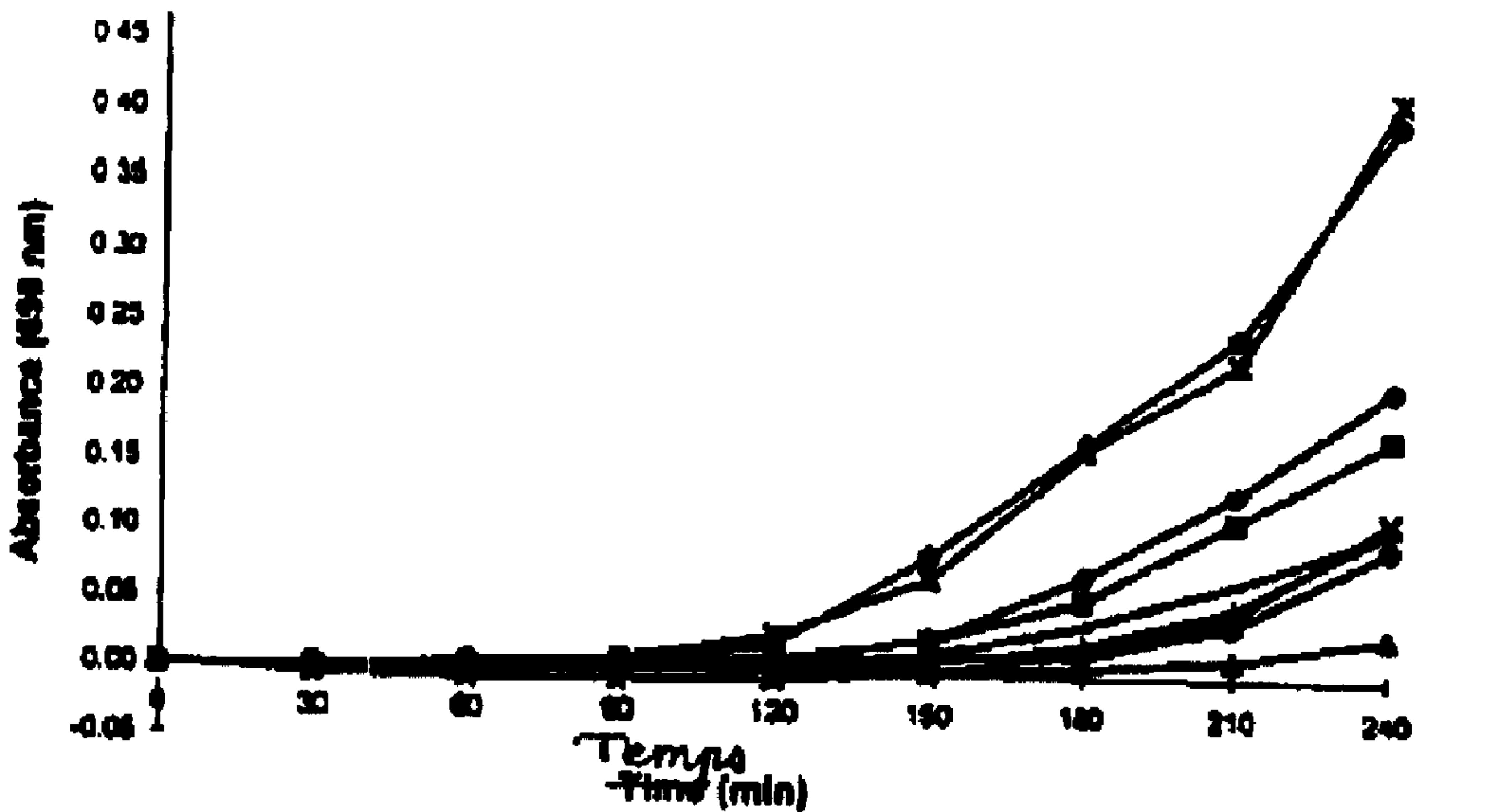


Fig. 6



- 7-nitrocoumarin
- methyl 7-nitrocoumarin-3-carboxylate
- 7-nitrocoumarin-3-carboxylic acid
- 3-acetyl-4-methyl-7-nitrocoumarin
- control (0.4% ethanol)
- 4-methyl-7-nitrocoumarin
- ethyl 7-nitrocoumarin-3-carboxylate
- 3-butytyl-7-nitrocoumarin
- 7-nitrocoumarin-3-carboxymorpholide