

(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
28 octobre 2004 (28.10.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/092400 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/04,
1/10

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/050139

(22) Date de dépôt international : 2 avril 2004 (02.04.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0304263 7 avril 2003 (07.04.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280
Marcy L'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : ORENGA,
Sylvain [FR/FR]; 164 route du Suran, Saint-André-le-Bas,
F-01600 Neuville sur Ain (FR). ROGER-DALBERT, Cé-
line [FR/FR]; 2 place des Droits de l'Homme, F-01150
Vaux en Bugey (FR). PERRY, John [GB/GB]; 12 Wolse-
ley Gdns., Jesmond, Newcastle-Upon-Tyne NE2HR (GB).
JAMES, Arthur [GB/GB]; Low House, Brackenthwaite,
Loweswater, Cockermouth Cumbria CA13 9UX (GB).

(74) Mandataire : DENJEAN, Frédérique; Chemin de
l'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasi-
en (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: MEDIUM FOR THE DETECTION AND IDENTIFICATION OF MICRO-ORGANISMS

(54) Titre : MILIEU DE DÉTECTION ET/OU D'IDENTIFICATION DE MICRO-ORGANISMES

(57) Abstract: The invention relates to a medium for detection and/or identification of microorganisms present in a sample, comprising a culture medium and at least one substrate which can be hydrolysed into a product marked by at least one first non-free enzyme in the sample and which is specific to microorganisms characterised in that it also comprises at least one inhibitor of at least one second enzyme which is different from the first enzyme or identical thereto but free in said sample and which does not originate from a micro-organism. The invention can be used, preferably, in the field of biomedical diagnostics or in food microbiology and more particularly in bacteriology and mycology.

(57) Abrégé : L'invention concerne un milieu de détection et/ou d'identification de microorganismes présents dans un échantillon, comprenant un milieu de culture et au moins un substrat qui peut être hydrolysé en un produit marqué par au moins une première enzyme non libre dans l'échantillon et, spécifique des microorganismes, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, au moins un inhibiteur d'au moins une deuxième enzyme, différente de la première enzyme ou identique à celle-ci mais libre dans ledit échantillon et ne provenant pas d'un microorganisme. La présente invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic biomédical ou en microbiologie alimentaire et plus particulièrement en bactériologie et mycologie.

WO 2004/092400 A2

Milieu de détection et/ou d'identification de microorganismes

Le domaine de l'invention est celui de l'analyse microbiologique par voie biochimique, et en particulier de la détection et de l'identification de microorganismes par ensemencement de milieux réactionnels.

Dans le cadre de l'invention, on s'intéresse plus particulièrement à la détection et à l'identification de microorganismes, tels que notamment des bactéries ou des levures, pathogènes ou indicateurs de qualité, que ce soit dans le milieu médical ou le milieu industriel.

Il existe actuellement de très nombreux milieux permettant la détection de ces microorganismes. Cette détection peut être basée notamment sur l'utilisation de substrats particuliers, spécifiques d'une enzyme du microorganisme que l'on souhaite détecter. D'une manière générale, les substrats synthétiques d'enzymes sont constitués d'une première partie spécifique de l'activité enzymatique à révéler, et d'une seconde partie faisant office de marqueur, généralement chromogène ou fluorescent. Par le choix de ces substrats, selon qu'il y a réaction ou non, il est possible de caractériser la nature d'un microorganisme.

Ainsi, dans le cas de bactéries, les souches d'*Escherichia coli* sont souvent mises en évidence par la révélation d'une activité enzymatique du type osidase telle que l'activité β -glucuronidase ou β -galactosidase. De la même façon, le genre *Listeria* peut être détecté par la mise en évidence d'une activité β -glucosidase.

Une activité aminopeptidase peut également être utilisée pour révéler un groupe, un genre ou une espèce de bactéries. Ainsi, l'activité alanine-aminopeptidase, par exemple, permet de différencier les bactéries à Gram négatif des bactéries à Gram positif.

Enfin, on peut citer également la détection d'une activité estérase pour notamment la mise en évidence du genre *Salmonella*. En effet, le genre *Salmonella* possède des estérases non spécifiques capables d'hydrolyser des substrats synthétiques chromogènes, par exemple indigéniques. Dans le cas de la détection de salmonelles, et plus généralement dans le cas de bactéries à activité estérase, la détection et/ou l'identification de ces bactéries est classiquement

réalisée sur des milieux gélosés ou liquides d'isolement, qui permettent la détection et/ou l'identification des colonies suspectes de bactéries à activité estérase.

Toutefois, on observe lors de certains prélèvements d'échantillons, notamment de selles, la présence d'enzymes, non spécifiques du microorganisme que l'on souhaite détecter, et libres
5 dans l'échantillon (on parle alors d'« enzymes libres »), et qui peuvent ultérieurement réagir avec le substrat chromogène. Ces enzymes « libres » peuvent notamment être présentes dans un prélèvement biologique, tel qu'un échantillon de selles, et provenir de cellules du tractus digestif, du foie, du pancréas et donc se retrouver via ces organes dans le prélèvement biologique. Des enzymes libres peuvent également être présentes dans des échantillons
10 alimentaires que l'on souhaite analyser, tels que par exemples des foies de volaille, dans ce cas les enzymes sont issues des cellules du foie. Cela induit la suspicion de positifs ne pouvant être confirmés : certains prélèvements sont considérés comme contaminés alors qu'ils ne le sont pas, ce qui peut avoir des conséquences dramatiques pour le diagnostic ultérieur. Ainsi, dans le cas de la détection de salmonelles mises en évidence par une activité enzymatique de
15 type estérase, le prélèvement de selles non contaminé par des salmonelles, peut contenir des estérases « libres » qui hydrolysent alors le substrat présent dans le milieu de culture, ce qui provoque la libération d'une coloration magenta, normalement spécifique des salmonelles.

La présente invention se propose donc d'améliorer les milieux permettant la détection de microorganismes actuellement commercialisés en limitant la présence de faux positifs
20 engendrée par la présence d'enzymes libres dans le prélèvement et non spécifique d'un micro-organisme. D'une manière surprenante, les inventeurs ont mis en évidence que l'utilisation de certains composés chimiques inhibaient les enzymes libres de l'échantillon, sans inhiber les enzymes non libres, c'est à dire les enzymes provenant des microorganismes que l'on souhaite détecter.

25

A cet effet, la présente invention concerne un milieu de détection de microorganismes présents dans un échantillon, tel que notamment un échantillon biologique ou alimentaire comprenant un milieu de culture et au moins un substrat qui peut être hydrolysé en un produit marqué par au moins une première enzyme non libre dans l'échantillon et spécifique desdits

microorganismes, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre au moins un inhibiteur d'au moins une deuxième enzyme, libre dans ledit échantillon et ne provenant pas du microorganisme recherché. Cette deuxième enzyme peut être différente de ladite première enzyme ou identique à celle ci.

5

Au sens de la présente invention, le terme microorganisme recouvre les bactéries, les levures, et plus généralement, les organismes généralement unicellulaire, invisibles à l'œil nu, qui peuvent être multipliés et manipulés en laboratoire.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le microorganisme est une bactérie, gram
10 négative ou positive, ou une levure.

A titre de bactéries Gram négatives, on peut citer les bactéries des genres suivants : *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Morganella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Branhamella*, *Neisseria*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Edwardsiella* et *Legionella*.

15 A titre de bactéries Gram positives, on peut citer les bactéries des genres suivants : *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Mycobacteria* et *Corynebacteria*.

A titre de levures, on peut citer les levures des genres suivants : *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* et *Trichosporon*.

20 Selon un mode préféré de l'invention, le microorganisme est une bactérie, qui appartient préférentiellement au genre *Salmonella*, ou une levure, qui appartient préférentiellement au genre *Candida*.

Au sens de la présente invention, on entend par milieu de culture, un milieu comprenant tous
25 les éléments nécessaires à la survie et/ou à la croissance de microorganismes. En pratique, l'homme du métier choisira le milieu de culture en fonction des microorganismes cibles, selon des critères parfaitement connus et à la portée de cet homme de l'art. Pour les bactéries, on peut citer à titre indicatif, les milieux sélectifs de type : Mac Conkey, Columbia ANC, PALCAM, et les milieux non sélectifs de type Trypcase soja, milieu nutritif. Pour les levures,

on peut citer comme milieu de culture Sabouraud Gentamycine-Chloramphénicol, ou Sabouraud .

Le milieu de culture selon l'invention peut contenir d'éventuels autres additifs comme par exemple : des peptones, un ou plusieurs facteurs de croissance, des hydrates de carbone, un
5 ou plusieurs agents sélectifs, des tampons, un ou plusieurs gélifiants... Ce milieu de culture peut se présenter sous forme de liquide de gel prêt à l'emploi, c'est à dire prêt à l'ensemencement en tube, flacon, ou sur boîte de Petri.

Au sens de la présente invention, le substrat est choisi parmi tout substrat pouvant être hydrolysé en un produit qui permet la détection, directe ou indirecte d'un microorganisme.

10 Préférentiellement, ce substrat comprend

- une première partie spécifique de l'activité enzymatique à révéler. Cette première partie est susceptible d'interagir avec ladite première enzyme, qui est spécifique du microorganisme recherché, mais également avec ladite deuxième enzyme,
- une seconde partie faisant office de marqueur, ci-après appelée partie marqueur, qui
15 peut être fluorescente ou chromogène.

Comme substrat fluorescent, on peut citer notamment les substrats à base d'umbelliférone ou d'aminocoumarine, à base de résorufine ou encore à base de fluorescéine.

Comme substrat chromogène, mieux adapté aux supports solides (filtre, gélose, gel d'électrophorèse), on peut citer notamment les substrats à base d'indoxyl et ses dérivés, et les

20 substrats à base d'hydroxyquinoline ou d'esculétine et leurs dérivés, qui permettent la détection d'activités osidase et estérase. On peut citer également les substrats à base de nitrophénol et nitroaniline et dérivés, permettant de détecter les activités osidases et estérases dans le cas de substrats à base de nitrophénol, et des activités peptidases dans le cas de substrats à base de la nitroaniline. On peut citer enfin les substrats à base de naphthol et
25 naphtylamine et ses dérivés, qui permettent de détecter les activités osidases et estérases par l'intermédiaire du naphthol, et les activités peptidases par l'intermédiaire de la naphtylamine.

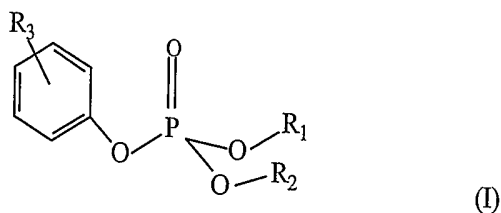
Ce substrat peut permettre notamment, mais d'une façon non limitative, la détection d'une activité enzymatique telle que l'activité d'une osidase, peptidase, estérase...

Par échantillon, on entend tout type d'échantillon dans lequel on souhaite détecter la présence de microorganismes. Cet échantillon peut être un échantillon biologique ou alimentaire. Cet échantillon peut provenir notamment, mais de façon non limitative, d'un prélèvement de sang, d'urine, de selles, d'aliments...

- 5 Par première enzyme, on entend une enzyme non libre dans l'échantillon, c'est à dire provenant du microorganisme que l'on souhaite détecter. Cette enzyme peut être notamment, mais de façon non limitative, une osidase, peptidase, estérase, sulfatases, phosphatase... Cette enzyme permet l'hydrolyse du substrat en un produit marqué.

- 10 Par deuxième enzyme, on entend une enzyme, différente de la première enzyme, ou identique à celle ci mais libre dans l'échantillon, c'est à dire qu'elle ne provient pas du microorganisme recherché. Cette deuxième enzyme est susceptible de réagir avec le substrat, ce qui peut induire la présence de faux positifs. Cette enzyme peut être notamment, mais de façon non limitative, une osidase, peptidase, estérase, sulfatases, phosphatase...

- 15 Selon un mode préféré de l'invention, ladite première enzyme est une estérase. Préférentiellement, l'inhibiteur appartient alors à la famille des organophosphates, et est un composé de formule (I)



dans laquelle

- 20
- R₁ est un atome d'hydrogène, ou un groupement alkyle, aryle, halogène
 - R₂ est un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle, aryle, halogène
 - R₃, est rien ou un groupement alkyle, aryle, NO₂

Selon l'invention, on entend notamment par aryle un noyau aromatique en C₆-C₁₀, notamment phényle, benzyle, 1-naphtyle ou 2-naphtyle.

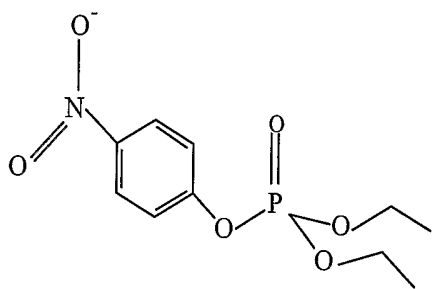
On entend par alkyle un alkyle en C₁-C₆, à savoir un alkyle droit ou ramifié ayant de 1 à 6 atomes de carbone. A titre d'exemple, on peut citer le méthyle, l'éthyle, le propyle, l'isopropyle, le butyle, le t-butyle, le pentyle, l'iso-pentyle et l'hexyle.

- 5 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'inhibiteur est un composé de formule (I) dans lequel

- R1 et R2 sont des groupements éthyl
- R3 est groupement NO₂

Ce composé est le O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate ayant la formule suivante :

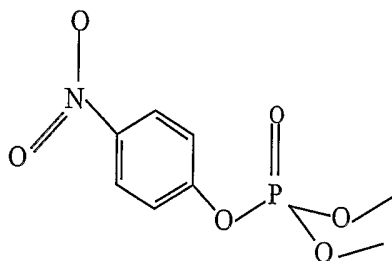
10



Selon un autre mode préféré de réalisation de l'invention, l'inhibiteur est un composé de formule (I) dans lequel

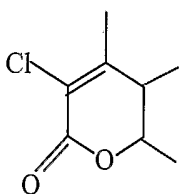
- 15
- R1 et R2 sont des groupements méthyl
 - R3 est un groupement NO₂

Ce composé est le O,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate ayant la formule suivante :



Selon un autre mode préféré de réalisation de l'invention, l'inhibiteur est un composé de formule (I) dans lequel

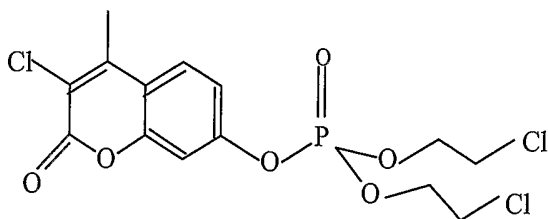
- R1 et R2 sont des groupement chloroethyl
- R3 est un cycle de formule



5

Les lignes pointillées permettent de visualiser la position dudit cycle dans le composé de formule (I) de l'invention.

Ce composé est le le O,O-Di (2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate ayant la formule suivante :



10

L'inhibiteur peut être également un dérivé des molécules présentées ci dessus.

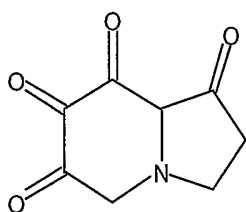
- 15 La concentration en O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate ou son dérivé dans le milieu de détection est préférentiellement comprise entre 0,1 et 15 mg/l, et encore plus préférentiellement entre 1 et 10 mg/l.

La concentration en O,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate ou son dérivé dans le milieu de détection est préférentiellement comprise entre 0,1 et 100 mg/l, et encore plus
20 préférentiellement entre 10 et 50 mg/l.

La concentration en O,O-Di(2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate ou son dérivé dans le milieu de détection est préférentiellement comprise entre 1 et 1000 mg/l, et encore plus préférentiellement entre 30 et 100 mg/l.

Selon un autre mode préféré de l'invention, ladite première enzyme est une osidase, préférentiellement une glucosidase et encore plus préférentiellement α -glucosidase. L'homme du métier pourra se référer à la publication de Le Merrer et al, 1997, Binorganic & Medical
 5 Chemistry, vol 5, N)3, pp 519-533 pour choisir un inhibiteur de glucosidase.

Préférentiellement, l'inhibiteur est une castanospermine, c'est à dire un composé de formule (II) :



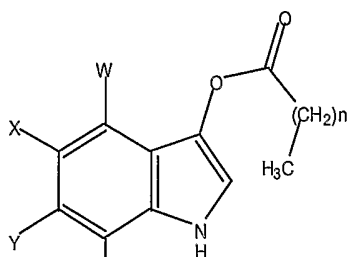
(II)

ou un dérivé de ce composé.

10 Des dérivés de la castanospermine sont notamment décrits dans la publication de Sondergarrd et al, Chem Eur J 2001, 7 n° 11.

La concentration en castanospermine ou son dérivé dans le milieu de détection est préférentiellement comprise entre 0.5 et 30 g/l, et encore plus préférentiellement entre 1 et 10
 15 g/l.

Selon un mode préféré de l'invention, ledit substrat est un substrat chromogène, préférentiellement un ester d'indoxyl ou de ses dérivés, et encore plus préférentiellement un ester d'indoxyl ayant la formule (III) suivante



(III)

avec n compris entre 1 et 12 et W, X, Y, Z sont choisis parmi H, Br, Cl, F, I.

D'une façon encore plus préférentielle, le substrat est le 5-Bromo-6-chloro-3-indoxyl caprylate (Magenta C8, N°CAS 209347-94-4) ou le 5-Bromo-3-indoxyl nonanoate (Biosynth).

5

L'invention concerne également un procédé de détection et/ou d'identification de microorganismes comprenant :

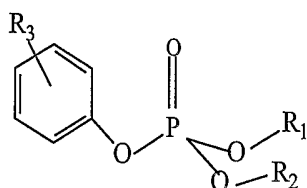
- l'ensemencement desdits microorganismes à identifier sur un milieu de détection, tel que définit précédemment,
- 10 • l'incubation du milieu de détection ensemencé avec lesdits microorganismes à identifier, et
- la détermination de la présence desdits microorganismes par la détection du ou des substrats hydrolysés en un produit marqué.

L'ensemencement des microorganismes, tels que notamment les bactéries ou levures peut être
 15 réalisée par toutes les techniques d'ensemencement bien connues de l'homme du métier. De même, l'incubation est réalisée préférentiellement à une température pour laquelle la croissance des microorganismes et l'activité enzymatique que l'on souhaite détecter sont maximales, que l'homme du métier peut choisir aisément selon l'activité enzymatique à détecter. A titre indicatif, l'incubation est préférentiellement réalisée entre 36 et 38°C.

20

L'invention concerne l'utilisation du milieu de détection et/ou d'identification tel que défini ci dessus pour identifier des microorganismes.

L'invention concerne également l'utilisation d'un composé de formule (I)



25

avec R1 est un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle ou aryle, halogène

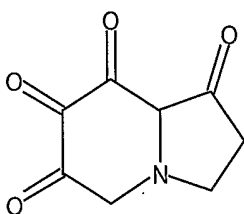
R2 est un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle ou aryle, halogène

R3 est rien ou un groupement alkyle, aryle, NO₂

pour inhiber une enzyme libre, préférentiellement une estérase libre dans un échantillon tel que

5 défini précédemment.

L'invention concerne également l'utilisation d'un composé de formule (II)



(II)

10 pour inhiber une enzyme libre, préférentiellement une osidase libre, préférentiellement une glucosidase libre, et encore plus préférentiellement une α -glucosidase libre dans un échantillon tel que défini précédemment.

Les exemples ci dessous sont donnés à titre explicatif et n'ont aucun caractère
15 limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

Exemple 1 : Inhibition des estérases libres dans un échantillon, par le O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate lors de l'identification de bactéries Salmonelles

Le but des expériences présentées dans cet exemple est de démontrer l'effet inhibiteur du
20 O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate (paraaxon® éthyl ; Riedel-deHaën, St Quentin Fallavier, France) sur des estérases libres (dans un échantillon de selles contaminé par des salmonelles).

Préparation du milieu de détection : un volume de 250 ml de milieu de détection est préparé à
25 partir d'une poudre de milieu ayant la composition suivante :

	Peptones	6,25 g/l
	Tris	0,16 g/l
	Lactose	6 g/l
	Sels biliaires	1,5 g/l
5	NaCl	5 g/l
	Agar	14 g/l

La fonte est réalisée à 100°C, et le milieu est autoclavé 15 minutes à 121°C. On ajoute ensuite les additifs dans le milieu : Magenta C8 (500mg/l; B-7102, BIOSYNTH, Staad, Suisse) ; X-glucoside (75 mg/l; B-7250, BIOSYNTH, Staad, Suisse) ; cefsulodine (10 mg/l; C 4786, Sigma, St Quentin Fallavier, France) et différentes concentrations de l'inhibiteur O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate (Paraoxon® éthyl; CAS n° 311-45-5 ; 36186, Riedel-de Haën, St Quentin Fallavier, France ; 0 ; 1 ; 5 ou 10 mg/l).

Les différents milieux de détection ainsi obtenus sont ensuite coulés en boîte de Petri.

15 Ensemencement des bactéries *Salmonella* : 10 µl de selles sont déposés sur boîte de Petri, cette suspension de selle est mélangée ou non à 10µl d'une suspension de *Salmonella* (0,5 McF) et isolée en 3 cadrans sur une boîte de Petri. Différentes selles et différentes souches de *Salmonella* provenant de la collection de la demanderesse sont utilisées selon ce protocole. Les boîtes de Petri sont incubées 24 heures à 37°C. La lecture de l'apparition d'une coloration au niveau du point de dépôt de la selle (colonne «dépôt») et au niveau des colonies de *Salmonella* (colonne «colonie») est effectuée selon une échelle semi-quantitative :

- 0 = absence de coloration
- 0,5 = trace de coloration
- 25 1 = coloration faible
- 2 = coloration forte .

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1.

		[O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate] en mg/l							
		0		1		5		10	
Souche	N° selle	Dépôt	Colonies	Dépôt	Colonies	Dépôt	Colonies	Dépôt	Colonies
absence	A	1	0	0,5	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i>	A	1	2	0,5	2	0	2	0	2
	B	0	2	0	2	0	2	0	2
<i>Salmonella</i> <i>Paratyphi A</i>	A	1	2	0,5	1	0	1	0	1
	B	0	2	0	1	0	1	0	1
<i>Salmonella</i> <i>Typhi</i>	A	1	1	0,5	1	0	1	0	1
	B	0	1	0	1	0	1	0	1

Tableau 1 : Effets de l'inhibiteur O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate sur l'activité des estérases libres dans un échantillon de selles lors de l'identification de bactéries

Salmonella

5

Comme le présente le tableau 1, la coloration est diminuée au niveau du point de dépôt de la selle en présence de l'inhibiteur, alors qu'elle est maintenue au niveau des colonies des bactéries que l'inhibiteur soit présent ou absent. Les enzymes libres dans les selles (dénommée dans l'exposé de l'invention « deuxième enzyme libre »), et qui se situent principalement au niveau du point de dépôt de la selle sont donc bien inhibées par l'inhibiteur, alors que les enzymes provenant des bactéries (dénommée dans l'exposé de l'invention « première enzyme non libre »), et qui se situent principalement au niveau des colonies de salmonelles, ne sont pas inhibées.

La coloration à l'endroit du dépôt, observé lors du dépôt de selles en l'absence de souche, démontre la présence d'une réaction liée à la présence d'enzymes libres du prélèvement, qui ne proviennent pas de la contamination par des Salmonelles.

Ces résultats démontrent que les réactions enzymatiques aspécifiques dues à la présence d'« enzymes libres » sont inhibées fortement en présence de l'inhibiteur O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate, ce qui limite la détection de faux positifs.

Exemple 2: Inhibition des estérases libres dans un échantillon, par le O,O-diméthyl p-nitrophenyl phosphate lors de l'identification de bactéries Salmonelles

Le but des expériences présentées dans cet exemple est de démontrer l'effet inhibiteur des estérases libres du O,O-Diméthyl p-nitrophenyl phosphate (paraaxon® méthyl ; Riedel-deHaën, St Quentin Fallavier, France) sur des sels contaminées par des salmonelles.

Préparation du milieu de détection : un volume de 250 ml de milieu de détection est préparé à partir d'une poudre de milieu ayant la composition suivante :

	Peptones	6,25 g/l
10	Tris	0,16 g/l
	Lactose	6 g/l
	Sels biliaires	1,5 g/l
	NaCl	5 g/l
	Agar	14 g/l

15 La fonte est réalisée à 100°C, et le milieu est autoclavé 15 minutes à 121°C. On ajoute ensuite les additifs dans le milieu : Magenta C8 (500mg/l ; B-7102, BIOSYNTH, Staad, Suisse) ; X-glucoside (75 mg/l ; B-7250, BIOSYNTH, Staad, Suisse) ; cefsulodine (10 mg/l ; C 4786, Sigma, St Quentin Fallavier, France) et différentes concentrations de l'inhibiteur O,O-Diméthyl p-nitrophenyl phosphate (Paraaxon® méthyl ; CAS n° 950-35-6 ;
20 Riedel-deHaën, St Quentin Fallavier, France ; 5, 10, 25 mg/l).

Les différents milieux de détection ainsi obtenus sont ensuite coulés en boîte de Petri.

Ensemencement des bactéries *Salmonella* : les boîtes de Petri sont inoculées, incubées et lues comme dans l'exemple 1.

25

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.

		[O,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate] en mg/l							
		0		5		10		25	
N° souche	N° selle	Dépôt	Colonies	Dépôt	Colonies	Dépôt	Colonies	Dépôt	Colonies
aucune	C	2	0	1	0	0,5	0	0	0
	D	2	0	1	0	1	0	0	0
<i>Salmonella</i>	C	2	0,5	1	0,5	0,5	1	0	0,5
<i>Typhi</i>	D	2	0,5	1	0,5	1	0,5	0	0,5
<i>Salmonella</i>	C	2	2	1	2	0,5	2	0	2
<i>Enteritidis</i>	D	2	2	1	2	1	2	0	2

Tableau 2 : Effets de l'inhibiteur O,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate sur l'activité des estérases libres dans un échantillon dans un échantillon lors de l'identification de bactéries *Salmonella*

5

Comme le présente le tableau 2, la coloration est diminuée au niveau du point de dépôt de la selle en présence de l'inhibiteur, alors qu'elle est maintenue au niveau des colonies des bactéries, que l'inhibiteur soit présent ou absent. Les enzymes libres dans les selles sont donc bien inhibées par l'inhibiteur, alors que les enzymes provenant des bactéries ne sont pas inhibées.

10

Ces résultats démontrent que les réactions enzymatiques aspécifiques dues à la présence d'« enzymes libres » sont inhibées fortement en présence de l'inhibiteur O,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate, ce qui limite la détection de faux positifs.

15

Exemple 3: Inhibition des estérases libres dans un échantillon par le O,O-Di (2-chloroethyl) -O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate lors de l'identification de bactéries salmonelles

Le but des expériences présentées dans cet exemple est de démontrer l'effet inhibiteur de O,O-Di (2-chloroethyl) -O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate (Haloxon® ; Sigma, St Quentin Fallavier, France) sur des estérases libres dans un échantillon (selles) contaminé par des Salmonelles.

20

Préparation du milieu de détection : 250 ml du milieu de l'exemple 1 dans lequel le O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate est remplacé par différentes concentrations de O,O-Di (2-chloroethyl) -O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate (Haloxon® ; CAS n°321-55-1 ; R276995, Sigma, St Quentin Fallavier, France; 0 ; 1 ; 10 ; 100 ou 1000 mg/l) sont
5 préparés selon le procédé de l'exemple 1.

Les différents milieux de détection ainsi obtenus sont ensuite coulés en boîte de Petri.

Ensemencement des bactéries *Salmonella* : les boîtes de Petri sont inoculées, incubées et lues comme dans l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.

10

		[O,O-Di (2-chloroethyl) -O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate] en mg/l									
		0		1		10		100		1000	
N° souche	N° selle	Dépôt	Colo- -nies	Dépôt	Colo- -nies	Dépôt	Colo- -nies	Dépôt	Colo- -nies	Dépôt	Colo- -nies
absence	A	2	0	1	0	1	0	0,5	0	0	0
	B	2	0	1	0	0,5	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i>	A	2	2	1	2	1	2	0,5	2	0	2
<i>Enteritidis</i>	B	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
<i>Salmonella</i>	A	2	2	1	2	1	2	0,5	1	0	0,5
<i>Paratyphi A</i>	B	0	2	0	2	0	2	0	1	0	0,5
<i>Salmonella</i>	A	2	1	1	1	1	1	0,5	1	0	1
<i>Typhi</i>	B	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1

Tableau 3 : Effets de l'inhibiteur O,O-Di (2-chloroethyl) -O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate sur l'activité des estérases libres dans un échantillon lors de l'identification de bactéries *Salmonella*

15 Comme le présente le tableau 3, la coloration est diminuée au niveau du point de dépôt de la selle en présence de l'inhibiteur, alors qu'elle est maintenue au niveau des colonies des bactéries, que l'inhibiteur soit présent ou absent. Les enzymes libres dans les selles sont donc bien inhibées par l'inhibiteur, alors que les enzymes provenant des bactéries ne sont pas inhibées. Ces résultats démontrent que les réactions enzymatiques aspécifiques dues à la

présence d' « enzymes libres » sont inhibées fortement en présence de l'inhibiteur O,O-Di (2-chloroethyl) -O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate, ce qui limite la détection de faux positifs.

5 **Exemple 4 : Inhibition des estérases libres dans un échantillon par le O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate, ,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate et le O,O-Di (2-chloroethyl) -O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate lors de l'identification de levures**

Le but des expériences présentées dans cet exemple est de démontrer l'effet inhibiteur des
10 estérases libres du O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate, ,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate et le O,O-Di (2-chloroethyl) -O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate sur des sélles contaminées par des levures *Candida*.

Préparation du milieu de détection : un volume de 250 ml de milieu de détection est préparé à
15 partir d'une poudre de milieu ayant la composition suivante :

Peptones	10 g/l
Glucose	1g/l
Tris	0,16 g/l
Agar	14 g/l

20 La fonte est réalisée à 100°C, et le milieu est autoclavé 15 minutes à 121°C. On ajoute ensuite les additifs dans le milieu : Magenta C8 (500mg/l; B-7102, BIOSYNTH, Staad, Suisse) ; X-glucoside (75 mg/l; B-7250, BIOSYNTH, Staad, Suisse) ; cefsulodine (10 mg/l; C 4786, Sigma, St Quentin Fallavier, France), ainsi que l'inhibiteur d'estérase :

- O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate: 5 mg/l
- 25 ➤ O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate: 25 mg/l ou
- O,O-Di (2-chloroethyl) -O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate: 75 mg/l

Les différents milieux de détection ainsi obtenus sont ensuite coulés en boîte de Petri.

Ensemencement des levures du genre *Candida* : 10 µl de selles sont déposés sur boîte de Petri, cette suspension de selle est mélangée ou non à 10µl d'une suspension de *Candida* (et isolée en 3 cadrans sur une boîte de Petri. Différentes selles et différentes souches du genre *Candida* provenant de la collection de la demanderesse sont utilisées selon ce protocole. Les boîtes de Petri sont incubées 24 heures à 37°C.

La lecture de l'apparition d'une coloration au niveau du point de dépôt de la selle et au niveau des colonies de *Candida* est effectuée selon une échelle semi-quantitative :

0 = absence de coloration

0,5 = trace de coloration

1 = coloration faible

2 = coloration forte .

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.

N° souche	N° selle	Sans inhibiteur		O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate: 5 mg/l		O,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate: 25 mg/l		O,O-Di (2-chloroethyl) -O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate : 75 mg/l	
		Dépôt	Colonies	Dépôt	Colonies	Dépôt	Colonies	Dépôt	Colonies
absence	A	2	0	0	0	0	0	0	0
	B	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	A	2	1	1	1	1	1	1	1
	B	2	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5
<i>Candida dubliniensis</i>	A	2	2	1	0.5	1	1	1	1
	B	2	1	1	0.5	1	1	1	1
<i>Candida krusei</i>	A	2	1	1	0.5	1	0.5	1	0.5
	B	2	1	1	0.5	1	0.5	1	0.5

Tableau 4 : Effets des inhibiteurs O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate , O,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate , O,O-Di (2-chloroethyl) -O-(3-chloro-4-

methylocoumarin-7-YL) phosphate sur l'activité des estérases libres dans un échantillon lors de l'identification de levures *Candida*

Comme le présente le tableau 4, la coloration est diminuée au niveau du point de dépôt de la selle en présence des différents inhibiteurs, alors qu'elle est maintenue au niveau des colonies
5 des levures, que l'inhibiteur soit présent ou absent. Les enzymes libres dans les selles sont donc bien inhibées par l'inhibiteur, alors que les enzymes provenant des levures ne sont pas inhibées.

Ces résultats démontrent que les réactions enzymatiques aspécifiques dues à la présence d'« enzymes libres » sont inhibées fortement en présence des inhibiteurs O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate, O,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate , O,O-Di (2-chloroethyl) -O-
10 (3-chloro-4-methylocoumarin-7-YL) phosphate, ce qui limite la détection de faux positifs.

Exemple 6 : Inhibition de l' α -glucosidases libre dans un échantillon par la castanospermine lors de l'identification de bactéries

15 Le but des expériences présentées dans cet exemple est de démontrer l'effet inhibiteur de la castanospermine sur l' α -glucosidase libres dans un échantillon (selles) contaminé par des souches de *Staphylococcus aureus*.

Préparation du milieu de détection : 250 ml du milieu de l'exemple 1 dans lequel le O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate est remplacé par différentes concentrations de
20 castanospermine : 0 ; 1 ; 2 ; 4 et 8 g/l) sont préparés selon le procédé de l'exemple 1.

Les différents milieux de détection ainsi obtenus sont ensuite coulés en boîte de Petri.

Ensemencement des souches de *staphylococcus aureus*: les boîtes de Petri sont inoculées,
25 incubées et lues comme dans l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6.

		[Castanospermine] en g/l									
		0		1		2		4		8	
N° souche	N° selle	Dépôt	Colo-nies	Dépôt	Colo-nies	Dépôt	Colo-nies	Dépôt	Colo-nies	Dépôt	Colo-nies
absence	A	2	0	1	0	1	0	0,5	0	0	0
	B	1	0	0,5	0	0,5	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 1	A	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 2	B	2	2	2	2	1	2	0,5	2	0	1

Tableau 6 : Effets de la Castanospermine sur l'activité des enzymes α -glucosidase libres dans un échantillon lors de l'identification de souches de *Staphylococcus aureus*

5

Comme le présente le tableau 6, la coloration est diminuée au niveau du point de dépôt de la selle en présence de la castanospermine, alors qu'elle est maintenue au niveau des colonies des bactéries, que l'inhibiteur soit présent ou absent. Les enzymes libres dans les selles sont donc bien inhibées par l'inhibiteur, alors que les enzymes provenant des bactéries ne sont pas inhibées.

10

Ces résultats démontrent que les réactions enzymatiques aspécifiques dues à la présence d'« enzymes libres » sont inhibées fortement en présence de l'inhibiteur castanospermine, ce qui limite la détection de faux positifs.

15

A noter qu'une variante aux exemples 1 à 6 consiste à ajouter l'inhibiteur dans le milieu de prélèvement au lieu de l'ajouter directement dans le milieu de culture.

Exemple 7 : Méthode pour identifier des inhibiteurs d'au moins une deuxième enzyme selon l'invention

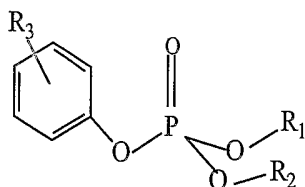
20

Cette méthode consiste à effectuer l'expérience des exemples 1 ou 2 en remplaçant :

- 5
- i) le milieu de culture décrit (y compris les substrats enzymatiques) par celui approprié aux microorganismes recherchés
 - ii) les selles par l'échantillon dans lequel on recherche lesdits microorganismes et qui produit une réaction parasite avec un ou plusieurs des substrats enzymatiques inclus dans le milieu
 - iii) l'inhibiteur O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate, ,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate, O,O-Di (2-chloroethyl) -O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate ou castanospermine par un inhibiteur potentiel à tester à différentes concentrations

REVENDICATIONS

1. Milieu de détection et/ou d'identification de microorganismes présents dans un échantillon, comprenant un milieu de culture et au moins un substrat qui peut être hydrolysé en un produit marqué par au moins une première enzyme non libre dans l'échantillon et, spécifique des microorganismes, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, au moins un inhibiteur d'au moins une deuxième enzyme, différente de la première enzyme ou identique à celle-ci mais libre dans ledit échantillon et ne provenant pas d'un microorganisme.
2. Milieu de détection et/ou d'identification, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le microorganisme est une bactérie.
3. Milieu de détection et/ou d'identification, selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite bactérie appartient au genre *Salmonella*.
4. Milieu de détection et/ou d'identification, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le microorganisme est une levure.
5. Milieu de détection et/ou d'identification, selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite levure appartient au genre *Candida*.
6. Milieu de détection et/ou d'identification, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite première enzyme est une estérase.
7. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'inhibiteur est un composé de formule (I)



avec R1 est un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle, aryle, halogène

R2 est un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle ou aryle, halogène

5 R3 est rien ou un groupement alkyle, aryle, NO2

8. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'inhibiteur est le O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate et/ou le O,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate et/ou le O,O-Di (2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate et/ou au moins un dérivé de ces molécules.

10

9. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 8, caractérisé en ce que la concentration en O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate ou son dérivé dans le milieu de détection est comprise entre 0,1 et 15 mg/l, préférentiellement entre 1 et 10 mg/l.

15

10. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 8, caractérisé en ce que la concentration en O,O-Dimethyl p-nitrophenyl phosphate ou son dérivé dans le milieu de détection est comprise entre 0,1 et 100 mg/l, préférentiellement entre 10 et 50 mg/l.

20

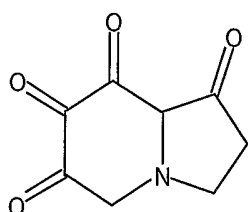
11. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 8, caractérisé en ce que la concentration en O,O-Di(2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate ou son dérivé dans le milieu de détection est comprise entre 1 et 1000 mg/l, préférentiellement entre 30 et 100 mg/l

25

12. Milieu de détection et/ou d'identification, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite première enzyme est une osidase, préférentiellement un glucosidase.

5 13. Milieu de détection et/ou d'identification selon l'une quelconque des revendications 12 caractérisé en ce que l'inhibiteur est un composé de formule (II):

(II)



ou un dérivé de ce composé

10 14. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 13 caractérisé en ce que la concentration en composé de formule (II) ou son dérivé dans le milieu de détection est préférentiellement comprise entre 1 et 10 g/l, et encore plus préférentiellement entre 2 et 8 g/l.

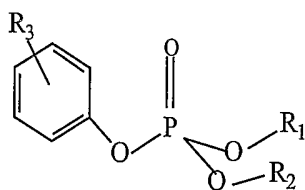
15 15. Milieu de détection et/ou d'identification selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 caractérisé en ce que ledit substrat est un substrat chromogène, préférentiellement un ester d'indoxyl ou de ses dérivés

16. Procédé détection et/ou d'identification de microorganismes comprenant :

- 20
- l'ensemencement des microorganismes à identifier sur un milieu de détection, selon l'une quelconque des revendications 1 à 15,
 - l'incubation du milieu de détection ensemencé avec les microorganismes à identifier, et
 - la détermination de la présence de microorganismes par la détection du ou
- 25 des substrats hydrolysés en un produit marqué.

17. Utilisation du milieu de détection et/ou d'identification selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 pour l'identification de microorganismes.

5 18. Utilisation d'un composé de formule (I)



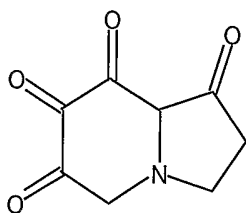
avec R1 est un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle, aryle, halogène

10 R2 est un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle, aryle, halogène

R3 est rien ou un groupement alkyle, aryle, NO₂

pour inhiber une enzyme libre dans un échantillon

19. Utilisation d'un composé de formule (II)



15

pour inhiber une enzyme libre dans un échantillon