

19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11) N° de publication : **2 876 703**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

21) N° d'enregistrement national : **04 11084**

51) Int Cl⁸ : C 12 Q 1/04 (2006.01), C 12 Q 1/66, 1/48, G 01 N 21/
76

12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 19.10.04.

30) Priorité :

43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.04.06 Bulletin 06/16.

56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71) Demandeur(s) : *TESTLIFE TECHNOLOGIES Société
à responsabilité limitée — FR.*

72) Inventeur(s) : CHAMPIAT DOMINIQUE.

73) Titulaire(s) :

74) Mandataire(s) : CABINET FEDIT LORIOT.

54) **ATP-METRIE A PARTIR DE NUCLEOTIDES ADENYLIQUES INTRACELLULAIRES POUR DETECTER ET
DENOMBRER DES CELLULES, UTILISATION ET PROCEDE DE MISE EN OEUVRE POUR LA
DETERMINATION DE BACTERIES NOTAMMENT DEPOURVUES D'ATP.**

57) La présente invention a trait à l'utilisation de la bioluminescence selon la réaction (1):

(1) luciférine + ATP + O₂ + Mg²⁺ + luciférase → oxyluciférine + photons

pour détecter et dénombrer les cellules vivantes d'une espèce donnée pouvant être présentes dans un échantillon liquide, ladite utilisation étant caractérisée en ce qu'elle met en oeuvre la mesure de la teneur en nucléotides adényliques (AN) intracellulaires libres totaux, exprimée sous forme d'ATP, de cellules vivantes d'une espèce non virale donnée, en tenant compte du fait que la somme des ATP, ADP et AMP intracellulaires libres de ladite famille est constante selon la relation (2):

(2) [AN] = [ATP] + [ADP] + [AMP] = Cte

après avoir transformé les ADP et AMP intracellulaires libres en ATP au moyen de myokinase et de pyruvate kinase, ladite mesure étant réalisée (i) sans ajout d'ATP et (ii) après ajout d'une quantité connue d'ATP.

Elle concerne également un procédé pour détecter et dénombrer les cellules par ATP-métrie.

FR 2 876 703 - A1



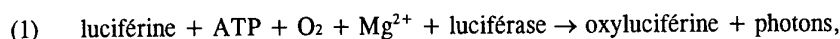
ATP-métrie à partir de nucléotides adényliques intracellulaires pour détecter et dénombrer des cellules, utilisation et procédé de mise en œuvre pour la détermination de bactéries notamment dépourvues d'ATP

5 ***Domaine de l'invention***

La présente invention a trait à une nouvelle technique d'ATP-métrie à partir de nucléotides adényliques (AN) intracellulaires libres pour détecter et dénombrer des cellules. Elle concerne également l'utilisation de cette nouvelle technique et un procédé de mise en œuvre pour la
10 détermination de bactéries notamment celles qui sont dépourvues d'ATP.

Art antérieur

On sait l'ATP-métrie, qui est fondée sur la réaction :



15

permet de mesurer efficacement la teneur en ATP d'un milieu. Cette réaction est spécifique de l'ATP, quel que soit le système utilisé luciférine (substrat)/luciférase (enzyme). Elle permet de distinguer les cellules mortes (dépourvues d'ATP) des cellules vivantes quand celles-ci
20 contiennent de l'ATP.

Dans le passé, on a cru (en vain) que la connaissance de la teneur en ATP intracellulaire provenant de la lyse de bactéries d'une même espèce pourrait permettre de détecter et dénombrer la population (i. e. nombre de souches par unité de volume) desdites bactéries. Voir à cet effet les
25 publications US 6200767 B, EP 1333097 A, US 6465201 B, Stender H. *et al.*, *Journal of Microbiological Methods*, 2001;46:69-75, et Lee J-Y. *et al.*, *Luminescence* 2004;19:31-36.

Les méthodes décrites dans ces publications sont efficaces pour l'étude de bactéries provenant d'une même culture de collection et se
30 trouvant toutes à un même état de développement (i.e. des bactéries qui ne sont pas au repos et contiennent toute la même teneur en ATP). En revanche, elles sont inefficaces vis-à-vis de pratiquement toutes les autres bactéries que l'on rencontre en particulier dans la nature, à savoir notamment (i) les bactéries qui ne contiennent pas d'ATP (c'est le cas
35 bactéries qui sont sous forme de spores, c'est à dire au repos), et (ii) des

bactéries qui se trouvent à des états de développements différents et qui de ce fait n'ont pas chacune la même teneur en ATP.

Or on sait que, à l'intérieur d'une même espèce ou variété de cellules, la teneur en AN intracellulaires libres totaux est constante, eu égard à la relation (2) :

$$(2) \quad [AN] = [ATP] + [ADP] + [AMP] = Cte$$

Voir à cet effet l'article de Champiat D. *et al.*, *Luminescence*, 2001;16:193-198, où il est proposé, d'une part, de transformer l'AMP et, respectivement, l'ADP en ATP au moyen de pyruvate kinase et, respectivement, de myokinase, et d'autre part, de mesurer la lumière émise (en RLU, i.e. en unité relative de lumière) sans ajout puis après ajout de 10 μ L d'ATP supplémentaire.

Par ailleurs dudit article de Champiat D., on connaît une technique d'évaluation de la présence de contaminants, tels que les microorganismes (notamment les bactéries), dans un échantillon aqueux provenant de l'eau de mer, de l'eau de boisson ou d'un aliment. Cette technique comprend la mise en contact d'un échantillon à tester avec l'ensemble luciférine + luciférase pour mesurer la lumière émise (i. e. mesurer avec amplification les photons produits) par la réaction (1) précitée en présence de microorganismes libérant de l'ATP, de l'ADP et/ou de l'AMP, avec transformation des ADP et AMP en ATP, d'une part, et avec et sans ajout d'ATP supplémentaire, d'autre part. Ledit article ne décrit ni ne suggère que cette technique est applicable à la détection et au dénombrement des cellules contenant au moins un des trois AN. En effet cet article ne vise que la mesure en RLU de la lumière émise sans penser pouvoir corrélérer les valeurs obtenues à la teneur en AN intracellulaires libres totaux puis au nombre de cellules ayant fourni lesdits AN intracellulaires libres totaux, ni suggérer cette corrélation.

But de l'invention

Il existe un besoin en ce qui concerne une technique permettant de détecter et de dénombrer les cellules, notamment les bactéries, les moisissures et les algues microscopiques, rapidement, efficacement et de façon nettement moins onéreuse que les méthodes EIA, RIA, FIA et PCR

actuellement préconisées.

Ce besoin se manifeste avec acuité quand on veut entreprendre la numération de microorganismes dépourvus d'ATP ou d'AN.

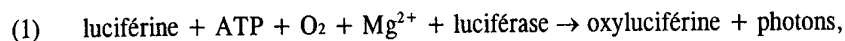
5 On se propose donc de fournir une nouvelle solution technique mettant en œuvre une ATP-métrie portant sur l'ensemble des AN intracellulaires libres totaux, exprimés sous forme d'ATP, pour satisfaire ce besoin.

Objet de l'invention

10 La présente invention permet de satisfaire ledit besoin pour toutes les cellules à l'exclusion des virus qui ne contiennent pas d'ATP (en fait les virus, qui n'ont pas d'AN, utilisent pour se développer l'ATP des cellules qu'ils infectent).

Selon un premier aspect de l'invention, on fournit une utilisation de la bioluminescence selon la réaction (1) :

15



pour détecter et dénombrer les cellules vivantes d'une espèce donnée pouvant être présentes dans un échantillon liquide, ladite utilisation étant
20 caractérisée en ce qu'elle met en œuvre la mesure de la teneur en nucléotides adényliques (AN) intracellulaires libres totaux, exprimée sous forme d'ATP, de cellules vivantes d'une espèce non virale donnée, en tenant compte du fait que la somme des ATP, ADP et AMP intracellulaires libres de ladite famille est constante selon la relation (2) :

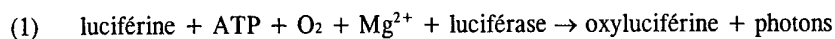
25

$$(2) \quad [\text{AN}] = [\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] = \text{Cte},$$

après avoir transformé les ADP et AMP intracellulaires libres en ATP au moyen de myokinase et de pyruvate kinase, ladite mesure étant réalisée (i)
30 sans ajout d'ATP et (ii) après ajout d'une quantité connue d'ATP.

Selon un second aspect de l'invention, on fournit un procédé pour détecter et dénombrer les cellules d'une espèce non virale donnée susceptibles d'être présentes dans un échantillon liquide (E), notamment des bactéries, par une méthode de bioluminescence selon la réaction (1)

35



ledit procédé, qui s'appuie sur le fait que pour une cellule vivante d'une espèce non virale donnée, la somme des nucléotides adényliques (AN) intracellulaires est constante selon la relation (2) :

$$(2) \quad [AN] = [ATP] + [ADP] + [AMP] = Cte$$

étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes consistant à :

- 10 (1°) isoler et concentrer les cellules de ladite espèce donnée susceptibles d'être présentes dans l'échantillon (E), après avoir éliminer les AN extracellulaires pouvant être contenus dans ledit échantillon ;
- (2°) lyser la paroi des cellules ;
- 15 (3°) traiter le milieu liquide résultant pour transformer les ADP et AMP intracellulaires qu'il contient et qui proviennent desdites cellules en ATP ;
- (4°) introduire dans le milieu résultant de l'étape (3°) une luciférine et une luciférase, d'abord (i) sans ajout d'ATP, puis (ii) après ajout d'une quantité connue d'ATP ;
- 20 (5°) mesurer le signal amplifié de la lumière émise par la réaction (1) sans ajout d'ATP, puis après ajout d'une quantité connue d'ATP ; et
- (6°) déterminer la teneur en AN totaux intracellulaires libres sous la forme d'ATP, par comparaison avec la reproduction des étapes (1°) à (5°) avec une population connue desdites cellules.
- 25

Selon un autre aspect de l'invention, on fournit une utilisation dudit procédé pour la numération de bactéries sous forme de spores qui de ce fait sont dépourvues d'ATP, d'une part, et un nécessaire de dosage pour mettre en œuvre ledit procédé, d'autre part.

Ledit nécessaire de dosage est caractérisé en ce qu'il comprend l'ensemble luciférine/luciférase de luciole, de l'ATP pour l'ajout dosé, de la myokinase, de la pyruvate kinase, et le cas échéant de la pyruvate orthophosphate dikinase et/ou de l'adénosine phosphate déaminase.

35 **Abréviations**

Par commodité, la liste des abréviations et acronymes utilisés dans la présente invention a été fournie ci-après.

ADP adénosine diphosphate,

AMP adénosine monophosphate,

5 AN nucléotide adénylique (autre nomenclature utilisable : adénosine nucléotide), l'ensemble des AN comprend ici les ATP, ADP et AMP,

ATP adénosine triphosphate,

cAMP adénosine monophosphate cyclique,

10 GDP guanosine diphosphate,

GTP guanosine triphosphate,

RLU unité relative de lumière.

Description détaillée de l'invention

L'échantillon (E), qui est une composition liquide aqueuse ou
15 organique, est avantageusement une composition aqueuse, et les cellules à tester sont avantageusement des bactéries. Cet échantillon (E) provient d'un prélèvement gazeux [notamment par barbotage], solide [notamment par contact, dissolution ou dispersion] ou liquide [notamment par extraction, dissolution ou émulsion] au moyen d'un liquide qui est
20 avantageusement aqueux.

La réaction (1) précitée fournit de l'oxyluciférine, des photons, de l'AMP et un ou plusieurs phosphates, principalement le pyrophosphate. Elle est caractéristique du vivant, dès lors que l'ATP intracellulaire libéré dans le milieu réactionnel n'a pas une longue durée de vie. Elle est
25 spécifique de l'ATP, la luciférine et la luciférase étant à une concentration optimale, le nombre de photons émis dès que ces trois substances sont en présence, est directement proportionnel à la quantité d'ATP. Dans l'organisme et ledit milieu réactionnel, l'ATP extracellulaire disparaît relativement rapidement, soit par réutilisation, soit principalement par
30 dégradation.

Par AN intracellulaires libres, on entend ici les AN présents à l'état libre dans la cellule, plus précisément dans le cytoplasme. L'invention ne s'intéresse donc pas aux AN non libres que l'on trouve dans la cellule et qui sont liés au niveau du DNA ou RNA.

35 L'ATP intervient dans la cellule en tant que source d'énergie

(énergie mécanique, énergie osmotique, énergie chimique, énergie calorique, énergie lumineuse) donneur de phosphate, donneur de pyrophosphate, donneur d'AMP et donneur d'adénosine.

La teneur en ATP dans les cellules d'une même espèce varie
5 fortement selon l'état physiologique; le seuil de détection se limite en général à 10^3 bactéries. Selon l'invention, on va atteindre une meilleure sensibilité qui va de 1 attomole d'ATP (sans stabilisation du signal lumineux émis) jusqu'à 0,5 attomole d'ATP (avec stabilisation dudit signal), ce qui correspond approximativement au contenu moyen en AN
10 intracellulaires libres totaux d'une bactérie.

Quand on considère la relation (2), on néglige ici la teneur intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) libre, qui est le précurseur intervenant dans la synthèse de l'AMP, car (i) la concentration intracellulaire de ce produit est relativement faible et surtout
15 (ii) la technique telle que proposée plus loin implique la transformation de l'ADP en AMP puis de l'AMP en ATP, ce qui diminue ladite teneur en cAMP.

On utilise selon l'invention le principe bien connu de la luciole (*Photinus pyralis*), qui fonctionne avec un enzyme (luciférase), un
20 substrat lumiphore (luciférine) et un coenzyme (en l'occurrence l'ATP). Le résultat est souvent affiché au photomètre (ou luminomètre) en RLU, qui bien que proportionnel à la quantité d'ATP, ne permet pas de déterminer d'un échantillon à l'autre la concentration réelle en ATP.

Pour remédier à cette difficulté, on préconise l'apport d'une quantité
25 connue (par exemple 10^2 à 10 pmol d'ATP), après la première lecture (entreprise sans apport d'ATP). Cependant, la technique de l'apport dit dosé ne permet pas une détermination quantitative de la numération car la teneur en ATP dans lesdites cellules ne reste pas constante : il y a un "turnover" rapide en fonction de l'état physiologique.

30 En revanche, les cellules d'une espèce donnée présentent toutes la même teneur en AN. Selon l'invention, en déterminant la teneur en AN, exprimée sous forme d'ATP, on va pouvoir réaliser des déterminations quantitatives pour la numération des cellules différentes des virus.

De façon avantageuse, l'étape (1°) du procédé de l'invention, qui est
35 relative à l'isolation et concentration, est effectuée par

- filtration sur membrane,
- évaporation-centrifugation, notamment sous vide et à température ambiante (15-25 °C), et/ou
- immunocapture.

5 La technique d'immunocapture est préférée. Elle permet la concentration et la purification des cellules par fixation de celles-ci au moyen d'anticorps immobilisés. De façon pratique, ces anticorps peuvent être dirigés contre des antigènes de surface des cellules sans détruire lesdites cellules. De façon également pratique, ces anticorps sont
10 immobilisé sur des billes de latex magnétique en vue de la concentration et de la purification des produits de conjugaison du type cellule-anticorps-bille dans un champ magnétique et du recueil desdits produits de conjugaison. En variante, des billes non magnétiques ou non magnétisables, liées aux anticorps qui fixent les cellules, permettent
15 également, par décantation, la concentration et la purification des cellules. En variante également, le stade de concentration/purification peut être réalisé sur colonne d'affinité.

Lesdits produits de conjugaison sont ensuite séparés, si nécessaire, notamment par élution, pour disposer d'une composition liquide
20 concentrée de cellules qui ne sont plus liées aux anticorps. Le cas échéant, pour limiter les dilutions qui diminuent la sensibilité, il peut être judicieux de concentrer ladite composition liquide au moyen d'un dispositif d'évaporation-centrifugation (opérant de 2000-10000 tours/15 minutes à 2000-10000 tours/1 minute), qui permet de sécher un grand nombre
25 d'échantillons en quelques minutes, sans perte de produits. L'évaporation-centrifugation à température ambiante offre l'avantage de pouvoir éliminer la majeure partie de l'eau du milieu contenant les cellules.

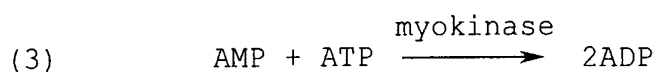
De façon également avantageuse, l'étape (2°) relative à la lyse de la paroi cellulaire est réalisée dans le milieu résultant de l'étape (1°) par
30 addition d'un tampon aqueux contenant

- (i) Tris plus EDTA, et/ou
- (ii) DMSO,

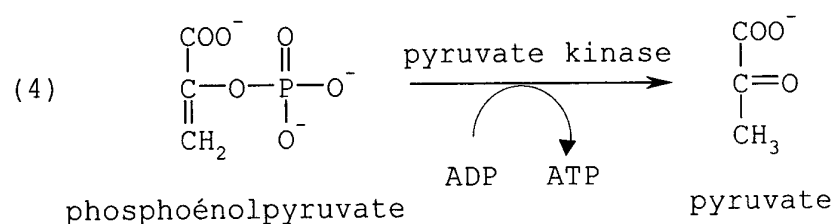
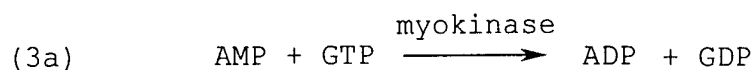
puis (a) traitement au micro-onde (pendant environ 1 minute) pour ouvrir les cellules, (b) refroidissement rapide (notamment au réfrigérateur) et, si
35 nécessaire, (c) centrifugation pour recueillir le milieu liquide résultant.

La lyse est requise afin de pouvoir accéder aux AN intracellulaires libres, transformer les ADP et AMP en ATP et mettre en contact l'ATP résultant de ladite lyse et/ou de ladite transformation avec le substrat (luciférine) et l'enzyme (luciférase).

5 Comme indiqué plus haut, l'étape (3°) relative à la transformation des ADP et AMP en ATP est réalisée au moyen de myokinase et de pyruvate kinase. Les mécanismes réactionnels sont les suivants :



10



15 Pour gagner du temps, l'étape (3°) du procédé de l'invention relative à la transformation des ADP et AMP en ATP peut être mise en œuvre en même temps que l'étape (2°).

De façon avantageuse, l'étape (4°) du procédé de l'invention est mise en œuvre avec la luciférine et la luciférase de luciole (*Photinus pyralis*). Le substrat et l'enzyme sont susceptibles d'être extraits ensemble de la luciole.

De façon pratique, il est recommandé de réaliser l'étape (5°) relative à la mesure de la lumière émise par la réaction (1) en présence d'une substance stabilisant l'émission de photons à une valeur sensiblement constante pendant au moins 10 minutes. Parmi les substances qui

25 conviennent à cet effet, on peut mentionner :

- la pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) qui transforme l'AMP et le pyrophosphate, produits au cours de la réaction (1) précitée, en ATP, et
- 30 • l'adénosine phosphate déaminase, qui dégrade l'ADP et/ou l'AMP résiduels pouvant être présents dans le milieu

réactionnel.

Le premier enzyme fournit un signal stable en régénérant l'ATP de façon sensiblement continue. Le second enzyme permet de diminuer le bruit de fond dû à la présence résiduelle d'ADP et/ou d'AMP, sans que le processus d'utilisation de l'ATP comme source d'énergie lumineuse soit perturbé.

Ledit second enzyme, l'adénosine phosphate déaminase, est plus avantageusement utilisé pour éliminer les résidus de nucléotides dans le milieu réactionnel et plus particulièrement pour écarter en les détruisant les résidus de nucléotides extracellulaires présents le cas échéant dans l'échantillon lors de l'étape (1°) précitée.

En pratique, pour stabiliser l'émission de photons conformément à la réaction (1), on recommande plus particulièrement l'utilisation de PPK à l'étape (5°).

Le procédé de l'invention est particulièrement adapté à la détection et à la numération (i) des bactéries sporulées, telles que l'anthrax, et (ii) des légionelles, des salmonelles et d'autres organismes unicellulaires tels que les amibes.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention seront mieux compris à la lecture qui va suivre d'exemples de réalisation. Bien entendu, ces éléments ne sont pas limitatifs, mais sont fournis à titre d'illustration.

Exemple 1

Numération d'Anthrax

A partir d'un prélèvement de 1 L d'air contenant des souches d'anthrax, à dénombrer, on obtient un échantillon aqueux par barbotage. On procède à l'immuno-capture des souches présentes au moyen d'une colonne comportant des anticorps polyclonaux anti(anthrax) immobilisés. On recueille les souches d'anthrax ainsi purifiées et concentrées dans un volume réduit de tampon aqueux. On concentre encore par évaporation-centrifugation sous vide à température ambiante. On élimine les résidus de nucléotides tels que les AN, susceptibles d'être présents dans le milieu aqueux résultant, au moyen d'adénosine phosphate déaminase qu'on inactive ensuite.

On procède à la lyse de la paroi des souches d'anthrax par addition de Tris et d'EDTA puis passage au micro-onde. Par centrifugation on

recueille le milieu liquide qui contient les AN intracellulaires. On ajoute de la myokinase et de la pyruvate kinase pour transformer les AMP et ADP en ATP. On ajoute la luciférine de luciole et la leuciférase de luciole avec de la PPDK pour stabiliser l'émission de photons.

5 On mesure les photons multipliés au moyen d'un dispositif connu en unités RLU. On ajoute 2 μ l d'ATP et remesure les photons multipliés en unité RLU.

On reproduit le même mode opératoire à partir d'une quantité connue (50 souches) d'anthrax, et détermine que le litre d'air de départ
10 contenait 65 souches d'anthrax.

Exemple 2

Numération de *Streptococcus faecalis*

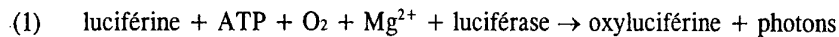
A partir du sol d'une bergerie présumée infectée par des
15 *Streptococcus faecalis*, on procède comme indiqué à l'exemple 1.

On observe que le sol contient 260 CFU/L de *Streptococcus faecalis*.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de la bioluminescence selon la réaction (1) :

5



pour détecter et dénombrer les cellules vivantes d'une espèce donnée pouvant être présentes dans un échantillon liquide, ladite utilisation étant caractérisée en ce qu'elle met en œuvre la mesure de la teneur en nucléotides adényliques (AN) intracellulaires libres totaux, exprimée sous forme d'ATP, de cellules vivantes d'une espèce non virale donnée, en tenant compte du fait que la somme des ATP, ADP et AMP intracellulaires libres de ladite famille est constante selon la relation (2) :

15

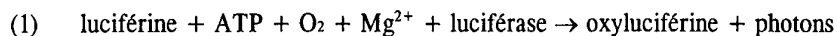
$$(2) \quad [\text{AN}] = [\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] = \text{Cte}$$

après avoir transformé les ADP et AMP intracellulaires libres en ATP au moyen de myokinase et de pyruvate kinase, ladite mesure étant réalisée (i) sans ajout d'ATP et (ii) après ajout d'une quantité connue d'ATP.

20

2. Procédé pour détecter et dénombrer les cellules d'une espèce non virale donnée susceptibles d'être présentes dans un échantillon liquide (E), notamment des bactéries, par une méthode de bioluminescence selon la réaction (1)

25



ledit procédé, qui s'appuie sur le fait que pour une cellule vivante d'une espèce non virale donnée, la somme des nucléotides adényliques (AN) intracellulaires est constante selon la relation (2) :

30

$$(2) \quad [\text{AN}] = [\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] = \text{Cte}$$

étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes consistant à :

(1°) isoler et concentrer les cellules de ladite espèce donnée susceptibles d'être présentes dans l'échantillon (E), après avoir éliminer les AN extracellulaires pouvant être contenus dans

35

- ledit échantillon ;
- (2°) lyser la paroi des cellules ;
 - (3°) traiter le milieu liquide résultant pour transformer les ADP et AMP intracellulaires contenus dans ledit milieu liquide en ATP ;
 - (4°) introduire dans le milieu résultant de l'étape (3°) une luciférine et une luciférase, d'abord (i) sans ajout d'ATP, puis (ii) après ajout d'une quantité connue d'ATP ;
 - (5°) mesurer le signal amplifié de la lumière émise par la réaction (1) sans ajout d'ATP, puis après ajout d'une quantité connue d'ATP ; et
 - (6°) déterminer la teneur en AN totaux intracellulaires libres sous la forme d'ATP, par comparaison avec la reproduction des étapes (1°) à (5°) avec une population connue desdites cellules.
3. Procédé suivant la revendication 2, notamment destiné à la détection quantitative d'une bactérie (B), ledit procédé étant caractérisé en ce que l'étape (1°) d'isolation et de concentration est effectuée par filtration sur membrane, évaporation-centrifugation, notamment sous vide, et/ou immunocapture.
4. Procédé suivant la revendication 2, notamment destiné à la détection quantitative d'une bactérie (B), ledit procédé étant caractérisé en ce que l'étape (2°) de la lyse de la paroi cellulaire est réalisée dans le milieu résultant de l'étape (1°) par addition d'un tampon aqueux contenant
- (i) Tris plus EDTA, et/ou
 - (ii) DMSO,
- puis (a) traitement au micro-onde pour ouvrir les cellules, (b) refroidissement rapide et, si nécessaire, (c) centrifugation pour recueillir le milieu liquide résultant.
5. Procédé suivant la revendication 2, notamment destiné à la détection quantitative d'une bactérie (B), ledit procédé étant caractérisé en ce que l'étape (3°) de la transformation des ADP et AMP en ATP est réalisée au moyen de myokinase et de pyruvate kinase.
6. Procédé suivant la revendication 2, notamment destiné à la détection quantitative d'une bactérie (B), ledit procédé étant caractérisé en ce que

l'étape (3°) est mise en œuvre en même temps que l'étape (2°).

7. Procédé suivant la revendication 2, notamment destiné à la détection quantitative d'une bactérie (B), ledit procédé étant caractérisé en ce que : l'étape (4°) est mise en œuvre avec la luciférine et la luciférase de luciole
5 (*Photinus pyralis*).

8. Procédé suivant la revendication 2, notamment destiné à la détection quantitative d'une bactérie (B), ledit procédé étant caractérisé en ce que l'étape (5°) de mesure de la lumière émise par la réaction (1) est réalisée en présence d'une substance stabilisant l'émission de photons à une valeur
10 sensiblement constante pendant au moins 10 minutes.

9. Procédé suivant la revendication 2, notamment destiné à la détection quantitative d'une bactérie (B), ledit procédé étant caractérisé en ce que : l'étape (6°) est mise en œuvre par comparaison avec un système d'abaques établi à partir de plusieurs populations connues desdites cellules
15 et de leurs teneurs en AN totaux intracellulaires libres exprimées sous forme d'ATP.

10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 2 à 9, caractérisé en ce que le seuil de sensibilité est de 0,5 à 1 attomole d'ATP.

11. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à
20 10 pour la numération des bactéries sous forme de spores.

12. Nécessaire de dosage mettant en œuvre le procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend l'ensemble luciférine/luciférase de luciole, de l'ATP pour l'ajout dosé, de la myokinase, de la pyruvate kinase, et le cas échéant, de la pyruvate
25 orthophosphate dikinase.



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 655922
FR 0411084

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	VALAT C ET AL: "Bioluminescence-based assay used for toxicity monitoring" COMMUNICATIONS IN AGRICULTURAL AND APPLIED BIOLOGICAL SCIENCES, vol. 68, no. 2A, 2003, pages 51-58, XP009050961 ISSN: 1379-1176 * le document en entier * -----	1-12	G01N21/76 C12Q1/66 C12Q1/48 C12Q1/04
A	VALAT CHARLOTTE ET AL: "Use of ATP bioluminescence to determine the bacterial sensitivity threshold to a bacteriocin." LUMINESCENCE (CHICHESTER), vol. 18, no. 5, 2003, pages 254-258, XP002336963 ISSN: 1522-7235 * le document en entier * -----	1-12	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12Q
A	CHAMPIAT D ET AL: "APPLICATIONS OF BIOCHEMILUMINESCENCE TO HACCP" LUMINESCENCE, WILEY, CHICHESTER, GB, vol. 16, mars 2001 (2001-03), pages 193-198, XP008048321 ISSN: 1522-7235 * le document en entier * -----	1-12	
A	STENDER HENRIK ET AL: "Combination of ATP-bioluminescence and PNA probes allows rapid total counts and identification of specific microorganisms in mixed populations" JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM,, NL, vol. 46, no. 1, 2001, pages 69-75, XP002228740 ISSN: 0167-7012 * le document en entier * -----	1-12	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		20 juillet 2005	Jacques, P
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 655922
FR 0411084

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	EP 1 333 097 A (CELSIS INTERNATIONAL PLC) 6 août 2003 (2003-08-06) * le document en entier * -----	1-12	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		20 juillet 2005	Jacques, P
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 2

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0411084 FA 655922

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 20-07-2005

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1333097 A	06-08-2003	EP 1333097 A2	06-08-2003
		US 2003157590 A1	21-08-2003
