(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

**INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**

PARIS

(11) **N° de publication :** **2 986 010**

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **12 50535**

(51) Int Cl[8] : ***C 12 Q 1/06*** *(2013.01)*

# (12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 19.01.12.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 26.07.13 Bulletin 13/30.

(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) :** *BIOMERIEUX* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** JAMES ARTHUR, ROGER-DALBERT CELINE, MERCIER CLAIRE et ORENGA SYLVAIN.

(73) **Titulaire(s) :** BIOMERIEUX.

(74) **Mandataire(s) :** BIOMERIEUX Société anonyme.

## (54) DETECTION IN VITRO DE MICROORGANISMES PRESENTANT UNE ACTIVITE AZOREDUCTASE.

(57) La présente invention porte sur l'utilisation d'au moins un composé azo pour la détection d'au moins un microorganisme dans un échantillon.

Plus précisément, la présente invention porte sur un procédé de détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un microorganisme présentant une activité azoréductase, comprenant les étapes consistant à:

mettre en contact l'échantillon avec un milieu réactionnel comprenant au moins un composé azo,

incuber ledit milieu réactionnel, et

détecter la réduction du composé azo par ledit microorganisme, indiquant la présence dudit au moins un microorganisme.

FR 2 986 010 - A1

# Détection *in vitro* de microorganismes présentant une activité azoréductase

La présente invention se rapporte au domaine de la microbiologie. Plus spécifiquement, elle porte sur un procédé de détection de microorganismes, dans un échantillon, comprenant une étape consistant à détecter la réduction, par lesdits microorganismes, d'un composé azo.

D'une manière générale, la détection de microorganismes dans un échantillon met en œuvre une étape de mise en contact dudit échantillon avec un milieu réactionnel et la détection de modifications dans ce milieu réactionnel, marqueurs de la présence de microorganismes. La méthode de détection de microorganismes ainsi mise en œuvre doit, de préférence, être substantiellement indépendante de la nature de l'échantillon dans lequel les microorganismes sont recherchés, et présenter une grande sensibilité.

Lorsque le milieu réactionnel est solide, la méthode consiste en l'observation directe de cellules ou en l'observation de la formation de colonies.

Un degré supplémentaire de complexité apparaît lorsqu'on souhaite automatiser la détection.

Une première méthode consiste en une observation du milieu réactionnel par néphélométrie ou turbidimétrie, c'est-à-dire par révélation de l'opacité du milieu réactionnel.

D'autres méthodes, par voie biochimique, automatisées ou non, font appel à la détection par colorimétrie ou fluorimétrie.

Il est possible de détecter la réaction entre l'échantillon et un réactif comprenant un hydrate de carbone comme le glucose, au moyen d'un indicateur de pH.

Il est possible de détecter la réaction entre l'échantillon et un indicateur chromogène ou fluorogène de réduction ou d'oxydoréduction, tel que rapporté dans le brevet EP 0424293 B1.

Il est possible d'utiliser des substrats enzymatiques de synthèse chromogènes ou fluorescents (pour une revue, voir Orenga *et al.*, 2009 ; J. Microbiol. Methods ; 79(2):139-55). De tels substrats sont le plus souvent adaptés à des activités enzymatiques spécifiques et permettent une détection ciblée de microrganismes dans des échantillons cliniques, alimentaires ou environnementaux.

Il est possible, en particulier lorsque le contenant du milieu réactionnel est un récipient scellé, de mettre en évidence un changement du pH ou de la concentration en $CO_2$, comme le rapporte le brevet EP 0790299 B1.

Au vu de cet art antérieur, il reste à ce jour des voies de recherche de substrats universels, et/ou permettant une réponse rapide, et/ou utilisables avec un échantillon complexe tel une matrice alimentaire, et/ou permettant la détection de germes difficiles à détecter. A cet égard, la présente invention porte sur une nouvelle méthode de détection d'au moins un microorganisme présentant une activité azoréductase, susceptible d'être présent dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact l'échantillon avec un milieu réactionnel comprenant au moins un composé azo. ;
- incuber ledit milieu réactionnel ; et
- détecter la réduction du composé azo par ledit au moins un microorganisme, indiquant la présence dudit microorganisme.

Les composés azo sont des molécules comprenant une ou plusieurs liaisons « azo », de type R1-N=N-R2. Ils sont essentiellement connus comme des colorants, utilisés dans l'industrie textile, plastique, cosmétique et agroalimentaire. Il a été rapporté que des systèmes enzymatiques microbiens et de mammifères dégradent les composés azo (Xu *et al.*, 2010 ; Anaerobe, 16 : 114-119). La présence d'une activité azoréductase chez des espèces bactériennes du colon humain a même mené à la synthèse de pro-drogues comprenant des polymères présentant des liaisons croisées azo (Chourasia & Kain, 2003 ; J. Pharm. Pharmacet. Sci., 6 (1) : 33-66).

Des composés comprenant une liaison azo ont également été décrits comme « quenchers », c'est à dire qu'ils vont modifier les propriétés de fluorescence d'un milieu ou d'un fluorophore, comme dans la demande WO 2005/049849. Ils peuvent alors être conjugués à des molécules biologiques telles les lipides, les acides nucléiques, les peptides, les protéines, etc. A ce titre, les dérivés azo sont utilisés pour le marquage d'oligonucléotides, pour la détection spécifique de séquences : l'oligonucléotide non hybridé est non fluorescent ; il y a émission de fluorescence lorsque celui-ci est hybridé sur sa séquence cible complémentaire.

La Demanderesse décrit ici une nouvelle utilisation de composés azo, mise en œuvre dans des méthodes de diagnostic *in vitro*, et de contrôle microbiologique, par exemple dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétologique ou dans le contrôle environnemental.

Les définitions qui suivent sont données dans le but de faciliter la compréhension de la présente invention.

Par échantillon biologique, on entend une petite partie ou petite quantité isolée d'une entité pour l'analyse. Ce peut être un échantillon clinique, humain ou animal, issu d'un prélèvement de liquide biologique, ou un échantillon alimentaire, issu de tout type d'aliment, d'un produit pharmaceutique ou cosmétologique, ou un échantillon de l'environnement de production ou de transformation d'aliments, de produits pharmaceutiques ou cosmétologiques. Cet échantillon peut être ainsi liquide ou solide. On peut citer d'une manière non limitative, un échantillon clinique de sang total, de sérum, de plasma, d'urines, de fèces, de prélèvements de nez, de gorges, de peau, de plaies, de liquide céphalo-rachidien, un échantillon alimentaire, d'eau, de boissons tels que le lait, un jus de fruits, de yaourt, de viande, d'œufs, de légumes, de mayonnaise, de fromage, de poisson…, un échantillon issu d'une alimentation destinée aux animaux, tel que notamment un échantillon issu de farines animales ou végétales, un échantillon pour contrôle de surface ou d'eau. Dans le cas de l'échantillon d'origine alimentaire, on parle également de matrice alimentaire.

Cet échantillon peut être utilisé tel quel ou, préalablement à l'analyse, subir une préparation de type enrichissement, dilution, extraction, concentration, purification, selon des méthodes connues de l'homme du métier.

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

A titre de bactéries à Gram négatif, 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, Aeromonas, Moraxella, Pasteurella, Providencia, Actinobacillus, Alcaligenes, Bordetella,*

*Cedecea, Erwinia, Pantoea, Ralstonia, Stenotrophomonas, Xanthomonas* et *Legionella*.

A titre de bactéries à Gram positif, on peut citer les bactéries des genres suivants : *Aerococcus, Enterococcus, Streptococcus, Staphylococcus, Bacillus, Lactobacillus, Listeria, Clostridium, Gardnerella, Kocuria, Lactococcus, Leuconostoc, Micrococcus, Falkamia, Gemella, Pediococcus, Mycobacterium* et *Corynebacterium*.

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

A titre de moisissures, on peut citer les moisissures des genres suivants : *Aspergillus, Fusarium, Geotrichum* et *Penicillium*.

Par milieu réactionnel, on entend un milieu comprenant tous les éléments nécessaires à l'expression d'un métabolisme et/ou à la croissance de microorganismes. Le milieu réactionnel peut être solide, semi-solide ou liquide. Par milieu solide, on entend par exemple un milieu gélifié. L'agar est l'agent gélifiant traditionnel en microbiologie pour la culture des microorganismes, mais il est possible d'utiliser de la gélatine, de l'agarose ou d'autres gélifiants naturels ou artificiels. Un certain nombre de préparations sont disponibles dans le commerce, comme par exemple l'agar Columbia, la gélose Trypcase-soja, la gélose Mac Conkey, la gélose Mueller Hinton ou plus généralement celles décrites dans le Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

Le milieu réactionnel peut comprendre un ou plusieurs éléments en combinaison, tels que des acides aminés, des peptones, des hydrates de carbone, des nucléotides, des minéraux, des vitamines ... Le milieu peut comprendre également un colorant. A titre indicatif, on peut citer comme colorant le bleu d'Evans, du rouge neutre, du sang de mouton, du sang de cheval, un opacifiant tel que l'oxyde de Titane, de la nitroaniline, du vert malachite, du vert brillant, un ou plusieurs indicateurs métaboliques, un ou plusieurs régulateurs métaboliques...

Le milieu réactionnel peut être un milieu de révélation ou un milieu de culture et de révélation. Dans le premier cas, la culture des microorganismes n'est pas nécessaire ou est effectuée avant ensemencement et, dans le deuxième cas, le milieu de détection et/ou de caractérisation constitue également le milieu de culture.

Le milieu réactionnel peut comprendre un ou plusieurs agents sélectifs. Par agent sélectif, on entend tout composé susceptible d'empêcher ou de ralentir la croissance d'un microorganisme autre que le microorganisme cible. Sans être limitatif, une

concentration comprise entre 0,01 mg/l et 5 g/l est particulièrement adaptée à la présente invention.

On peut citer comme agent sélectif, les antibiotiques, les antifongiques, les sels biliaires, le crystal violet, la fushine basique, le vert brillant, ... Par antibiotique, on entend tout composé susceptible d'empêcher ou de ralentir la croissance d'une bactérie. Ils appartiennent notamment aux groupes des beta-lactamines, des glycopeptides, des aminosides, des polypeptides, des sulfamides, des quinolones.

Par antifongique, on entend tout composé susceptible d'empêcher ou de ralentir la croissance d'une levure ou d'une moisissure. A titre indicatif, on peut citer notamment l'amphotéricine B, le fluconazole, l'itraconazole, le voriconazole, la cycloheximide.

Par composé azo, on entend toute molécule comprenant au moins un groupement azo, c'est-à-dire au moins une liaison de type $R_1$-N=N-$R_2$.

Par azoréductase, on entend toute enzyme, quelle que soit sa structure et sa classification, qui est capable de réduire une fonction azo.

Par réduction, en pratique, on entend réduction de la double liaison azo (-N=N-). Cette réduction peut être totale et conduire à la formation de deux résidus amines (-NH2), mais elle peut être partielle et conduire à une liaison partiellement-réduite par exemple –NH-NH-.

Par substrat ou substrat chromogène, on entend un composé permettant la détection d'une activité enzymatique ou métabolique grâce à un signal détectable directement ou indirectement. Préférentiellement, ladite activité enzymatique ou métabolique est celle d'un microorganisme. Par substrat chromogène, on entend un composé permettant la détection d'une activité enzymatique ou métabolique grâce à la variation d'un signal optique telle qu'une variation d'absorbance et/ou de fluorescence. Pour une détection directe, ce substrat peut être lié à une partie faisant office de marqueur, fluorescent ou coloré (Orenga *et al.*, 2009 ; J. Microbiol. Methods ; 79(2):139-55). Pour une détection indirecte, le milieu réactionnel selon l'invention peut comporter en sus un indicateur de pH, sensible à la variation de pH induite par la consommation du substrat et révélant le métabolisme des microorganismes cibles. Ledit indicateur de pH peut être un chromophore ou un fluorophore. On citera comme exemples de chromophores le bromocresol pourpre, le bleu de bromothymol, le rouge neutre, le bleu d'aniline, le bleu de bromocresol. Les

fluorophores comprennent par exemple la 4-méthylumbelliferone, les dérivés de l'hydroxycoumarine, les dérivés de fluorescéine ou les dérivés de la résorufine.

A titre indicatif, les activités enzymatiques ciblées pas les substrats chromogènes peuvent appartenir au groupe des hydrolases, préférentiellement aux groupes des osidases, des estérases ou des peptidases. Préférentiellement, les activités enzymatiques ciblées par les substrats chromogènes sont choisies parmi : la glucuronidase, la glucosidase, la galactosidase, l'estérase, la sulfatase et la désaminase. Bien entendu, les composés azo mis en œuvre dans le procédé selon l'invention correspondent à des substrats détectant une activité azoréductase.

Par incuber, on entend porter et maintenir entre 5 minutes et 48 heures, préférentiellement entre 4 et 24 heures, plus préférentiellement entre 16 et 24 heures, à une température appropriée, généralement comprise entre 20 et 50°C, préférentiellement entre 30 et 40°C.

Par détecter, on entend déceler à l'œil nu ou à l'aide d'un appareil optique l'existence d'une croissance et/ou d'une activité des bactéries cibles. Avantageusement, lorsque le milieu mis en œuvre comprend un substrat chromogène, la détection peut également permettre une caractérisation des microorganismes cibles.

Par quencher, on entend un élément qui permet de diminuer l'intensité de fluorescence d'une substance donnée. Un quencher peut être défini comme un extincteur, par absorption de l'énergie d'excitation ou d'émission. Le quenching peut alors être défini comme une extinction ou un étouffement de la longueur d'onde d'excitation ou d'émission, ou par la substitution d'un groupement sur une molécule, ladite substitution induisant une modification de la capacité d'excitation des électrons. Par groupement, on entend des groupes ou des restes azotés, hydroxylés, thiols, carbonés, méthyle, propyle, butyle, phényle etc.

La présente invention porte sur un procédé de détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un microorganisme présentant une activité azoréductase, comprenant les étapes consistant à :

a) mettre en contact l'échantillon avec un milieu réactionnel comprenant au moins un composé azo,
b) incuber ledit milieu réactionnel, et
c) détecter la réduction du composé azo par ledit microorganisme, indiquant la présence dudit au moins un microorganisme.

Avantageusement, l'étape c) permet également un dénombrement des microorganismes.

Avantageusement, le procédé selon l'invention permet la caractérisation (ou identification) d'au moins un groupe de microorganismes. En d'autres termes, il permet à la fois de détecter et de déterminer quel groupe de microorganismes est détecté.

La plupart des composés azo sont colorés à l'état oxydé et incolores à l'état réduit. La réduction des composés azo peut conduire à la formation d'un composé fluorescent. Ainsi, de façon préférentielle, la réduction du composé azo est détectée en mesurant une variation d'absorbance ou de fluorescence . Préférentiellement, la réduction du composé azo est détectée par la disparition d'une coloration et/ou par l'apparition d'une fluorescence.

Selon la présente invention, l'étape d'incubation peut être effectuée en aérobiose ou en anaérobiose, autrement dit en présence ou en absence d'oxygène. En effet, l'activité des microorganismes, détectée selon la présente invention, est liée au métabolisme respiratoire, aérobie et/ou anaérobie, des microorganismes. La majorité des microorganismes possède donc ce type d'activité.

Selon un mode de réalisation particulier, les composés azo mis en œuvre dans le procédé selon l'invention peuvent être couplés à un fluorophore dont la longueur d'onde d'émission ou la longueur d'onde d'excitation est quenchée par la coloration du composé azo.

Selon un autre mode de réalisation particulier, les composés azo mis en œuvre dans le procédé selon l'invention peuvent quencher la fluorescence d'une autre molécule.

Pour résumer, il est possible :

- de détecter la disparition de la coloration du composé azo ;
- de détecter la fluorescence naturelle d'un produit de la réduction ; ou

- de détecter un fluorophore couplé avec le composé azo ou un fluorophore correspondant à une molécule différente, la fluorescence apparaissant par disparition du phénomène de quenching.

Parmi les fluorophores préférés, on citera de façon non restrictive les coumarines parmi lesquelles l'AMC (7-Amino-4-méthyl-coumarine), la 4-MU (4-Méthyl umbelliferone), les dérivés de la fluorescéine, etc.

Le couplage entre le fluorophore et le composé azo peut être un couplage intramoléculaire, ou un couplage intermoléculaire. Par couplage intramoléculaire, on entend que le fluorophore est lié de façon covalente au composé azo. Par exemple, le composé azo peut être couplé avec un fluorophore, susceptible d'être excité ou d'émettre à la longueur d'onde d'absorbance du composé azo oxydé. Le composé oxydé, coloré, masque alors la fluorescence. Après réduction, le composé est décoloré et laisse apparaître la fluorescence par disparition du phénomène de quenching intramoléculaire.

Par couplage intermoléculaire, on entend que le fluorophore et le composé azo sont deux molécules chimiques différentes. La réduction du composé azo entraine alors l'apparition possible d'une fluorescence par disparition du phénomène de quenching intermoléculaire.

Avantageusement, le milieu réactionnel mis en œuvre dans le procédé selon l'invention comprend en outre au moins un second substrat susceptible de détecter une activité enzymatique. Préférentiellement, ledit substrat est un substrat chromogène, c'est-à-dire que le métabolisme dudit substrat produit une coloration ou une fluorescence. Préférentiellement, ladite activité enzymatique est différente de l'activité azoréductase.

Le procédé selon l'invention présente un intérêt particulier pour les échantillons de type alimentaire. Actuellement, la détection de la flore totale selon un kit disponible commercialement utilise trois substrats fluorescents et autorise une lecture du résultat en 48 heures. L'inconvénient est que certaines matrices alimentaires présentent des réactions croisées avec ce kit. En d'autres termes, une réaction enzymatique aspécifique liée à l'aliment lui-même mène à des résultats faussement

positifs. Les essais réalisés avec des composés azo montrent que les matrices alimentaires qui présentent le plus de faux positifs dans ce test de détection de la flore totale ne présentent pas de bruit de fond avec le composé azo.

Ainsi, de façon avantageuse, le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre dans un conteneur solide de type microplaque, microtube, microcupule, capillaire, carte multipuit telle que carte VITEK® ou carte TEMPO®. De façon préférentielle, la carte réactionnelle est une carte VITEK® ou une carte TEMPO®

Enfin, l'invention concerne également l'utilisation d'au moins un composé azo pour la détection d'au moins un microorganisme compris dans un échantillon.

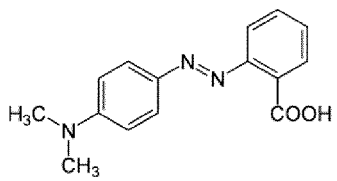
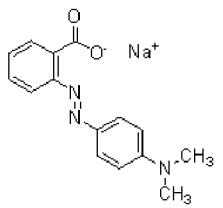
Les exemples développés ci-dessous ont pour but de faciliter la compréhension de l'invention. Ils sont donnés à titre explicatif et ne sauraient limiter la portée de l'invention.

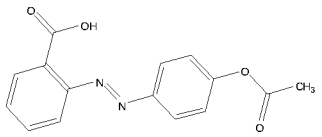
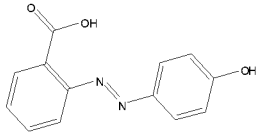
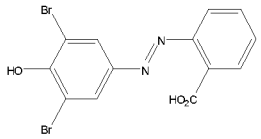
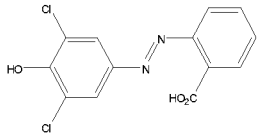
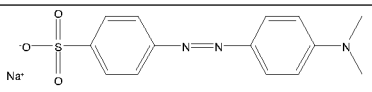
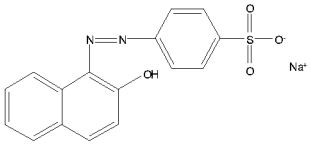
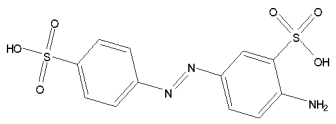
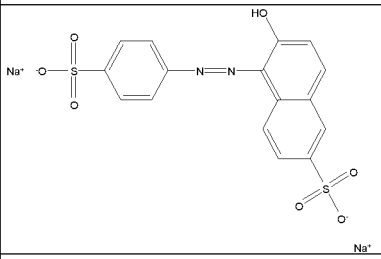
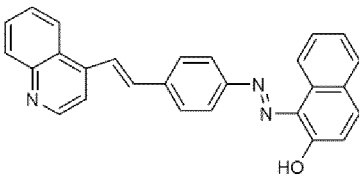
**Exemple 1**

**Tests de Réduction sur 24h à 35°C de composés possédant une fonction « azo » par 10 souches représentant 10 espèces de microorganismes.**

On teste, en plaque de microtitration, la réduction de la fonction « azo » des substrats listés dans le tableau I par les espèces listées dans le tableau II, chaque espèce étant représentée par une souche.

**Tableau I**

| | |
|---|---|
| Methyl red |  |
| 3-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid sel de sodium |  |

| | |
|---|---|
| 2-(4-acetoxyphenylazo) benzoic acid |  |
| 3-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid |  |
| 2-Hydroxy-3,5-dibromophenylazo) benzoic acid |  |
| 2-(4-hydrox-3,5-dichlorophenylazo) benzoic acid |  |
| Methyl orange |  |
| Orange II |  |
| 4-aminoazobenzene-3,4'-disulfonic acid |  |
| Sunset Yellow |  |
| BF38 = 4''-Quinoline-4'-styryl-azo-2-Hydroxynaphthol |  |

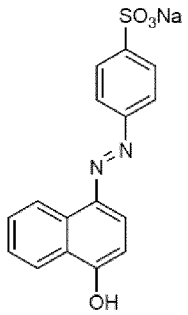
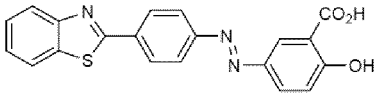
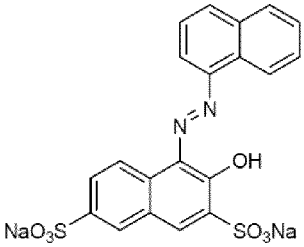
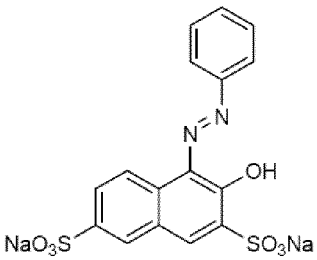
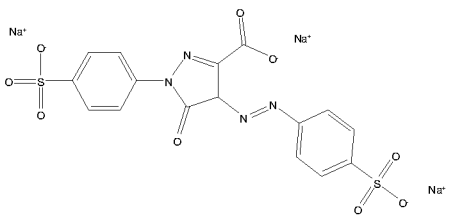
| | |
|---|---|
| Orange I |  |
| BF45 = Acide 2-Phenyl-benzothiazole-4'-azo-4''-hydroxybenzene-3''-carboxylïque |  |
| Bordeaux B |  |
| Ponceau 2G |  |
| Tartrazine |  |

**Tableau II**

| |
|---|
| *Escherichia coli* |
| *Cronobacter muytjensii* |
| *Acinetobacter baumanii* |
| *Pseudomonas aeruginosa* |
| *Staphylococcus aureus* |
| *Staphylococcus epidermidis* |
| *Kocuria rosea* |
| *Enterococcus faecalis* |
| *Candida albicans* |
| *Geotrichum candidum* |

Le milieu réactionnel est constitué de :

Bouillon trypcase soja

Substrat 35mg/l

Inoculum 0,5 MacFarland

La réduction du substrat et la croissance des microorganismes sont suivies à l'aide d'un lecteur de microplaque Infinite® M200 TECAN à 35°C sur 24h.

La croissance est suivie par l'absorbance à 660nm et la réduction des substrats par absorbance et fluorescence aux longueurs d'onde spécifiques indiquées dans le tableau III.

**Tableau III**

| | $I_{max}$ Absorption (nm) | $I_{max}$ excitation (nm) | $I_{max}$ emission (nm) |
|---|---|---|---|
| Methyl red | 435 | 250 | 395 |
| 3-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid sel de sodium | 435 | 250 | 395 |
| 2-(4-acetoxyphenylazo) benzoic acid | 345 | 250 | 395 |
| 3-(4-hydroxyphenyazo) benzoic acid | 355 | 250 | 394 |
| 2-(4-hydroxy-3,5-dibromophenylazo) benzoic acid | 410 | 250 | 396 |
| 2-(4-hydroxy-3,5-dichlorophenylazo) benzoic acid | 355 | 250 | 395 |
| Methyl orange | 470 | 255 | 337 |
| Orange II | 490 | 348 | 446 |
| 4-aminoazobenzene-3,4'-disulfonic acid | 380 | 329 | 437 |
| Sunset Yellow | 485 | 367 | 476 |
| BF38 | 390 | 341 | 505 |
| Orange I | 483 | 320 | 473 |
| BF45 | 392 | 337 | 421 |
| Bordeaux B | 530 | 320 | 445 |
| Ponceau 2G | 496 | 320 | 486 |
| Tartrazine | 435 | 255 | 336 |

Le substrat est considéré comme réduit par les microorganismes quand le substrat est décoloré (suivi par la diminution de l'absorbance) (Decol) et/ou quand la fluorescence du substrat est multipliée par 2 par rapport à la fluorescence de base d'un témoin sans substrat (Fluo). La croissance est indiquée par Co. Le sigle « + » signifie bonne croissance/décoloration/augmentation de fluorescence significative. Le sigle « +/- » signifie une croissance difficile. Le sigle « – » signifie qu'il n'y a pas de croissance/décoloration/augmentation de fluorescence significative. RED indique si le substrat est réduit (O) ou non (N).

## Tableau IV

| | Espèces Gram - | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *E. coli* | | | | *E. muytjensii* | | | | *A. baumannii* | | | | *P. aeruginosa* | | | |
| | Co | Decol | Fluo | RED | Co | Decol | Fluo | RED | Co | Decol | Fluo | RED | Co | Decol | Fluo | RED |
| Methyl red | + | + | + | O | + | + | + | O | + | + | + | O | + | +/- | + | O |
| 2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid sel de sodium | + | + | + | O | + | + | + | O | + | + | + | O | + | +/- | + | O |
| 2-(4-acetoxyphenylazo) benzoic acid | + | + | + | O | + | + | + | O | + | + | + | O | + | - | - | N |
| 2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid | + | + | + | O | + | + | + | O | + | + | + | O | + | +/- | + | O |
| 2-(4-hydroxy-3,5-dibromophenylazo) benzoic acid | + | - | + | O | + | + | + | O | + | - | + | O | + | - | - | N |
| 2-(4-hydroxy-3,5-dichlorophenylazo) benzoic acid | + | + | + | O | + | + | + | O | + | + | + | O | + | - | + | O |
| Methyl orange | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N |
| Orange II | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N |
| 4-aminoazobenzene-3,4'-disulfonic acid | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N |
| Sunset Yellow | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N |
| BF45 | + | - | + | O | - | - | - | N | + | - | + | O | + | - | - | N |
| Orange I | + | + | - | O | + | + | - | O | + | +/- | - | O | + | - | - | N |
| BF38 | + | + | - | O | + | + | - | O | + | - | - | N | + | + | - | O |
| Bordeaux B | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N |
| Ponceau 2G | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N |
| Tartrazine | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N | + | - | - | N |

| | Espèces Gram + | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *S. aureus* | | | | *S. epidermidis* | | | | *E. faecalis* | | | | *K. rosea* | | | |
| | Co | Decol | Fluo | RED | Co | Decol | Fluo | RED | Co | Decol | Fluo | RED | Co | Decol | Fluo | RED |
| Methyl red | + | + | + | O | + | + | + | O | + | + | + | O | +/- | +/- | + | O |
| 2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid sel de sodium | + | + | + | O | + | + | + | O | + | + | + | O | - | +/- | + | O |
| 2-(4-acetoxyphenylazo) benzoic acid | + | + | + | O | + | + | + | O | + | + | + | O | - | - | - | NA |
| 2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid | + | + | + | O | + | + | + | O | + | + | + | O | +/- | - | + | O |
| 2-(4-hydroxy-3,5-dibromophenylazo) benzoic acid | + | + | + | O | + | +/- | + | O | + | + | + | O | - | - | - | NA |
| 2-(4-hydroxy-3,5-dichlorophenylazo) benzoic acid | + | + | + | O | + | + | + | O | + | + | + | O | - | - | - | NA |
| Methyl orange | + | - | - | N | + | - | - | N | + | + | + | O | - | - | - | NA |
| Orange II | + | - | - | N | + | - | - | N | + | + | + | O | - | - | - | NA |
| 4-aminoazobenzene-3,4'-disulfonic acid | + | - | - | N | + | - | - | N | + | + | + | O | - | - | - | NA |
| Sunset Yellow | + | - | - | N | + | - | - | N | + | + | + | O | - | - | - | NA |
| BF45 | + | + | + | O | - | - | + | O | + | + | + | O | + | - | + | O |
| Orange I | + | + | - | O | + | + | - | O | + | + | - | O | - | - | - | NA |
| BF38 | + | + | - | O | + | + | - | O | + | + | - | O | - | - | - | NA |
| Bordeaux B | + | - | - | N | + | - | - | N | + | + | + | O | - | - | - | NA |
| Ponceau 2G | + | - | - | N | + | - | - | N | + | + | - | O | - | - | - | NA |
| Tartrazine | + | - | - | N | + | - | - | N | + | + | +/- | O | - | - | - | NA |

| | Espèces de levures | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *C. albicans* | | | | *G. candidum* | | | |
| | Co | Decol | Fluo | RED | Co | Decol | Fluo | RED |
| Methyl red | + | + | + | O | +/- | +/- | + | O |
| 2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid sel de sodium | + | - | - | N | + | + | + | O |
| 2-(4-acetoxyphenylazo) benzoic acid | + | - | - | N | + | + | + | O |
| 2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid | + | - | - | N | +/- | - | - | N |
| 2-(4-hydroxy-3,5-dibromophenylazo) benzoic acid | + | - | - | N | + | - | + | O |
| 2-(4-hydroxy-3,5-dichlorophenylazo) benzoic acid | + | - | - | N | + | + | + | O |
| Methyl orange | + | - | - | N | + | - | - | N |
| Orange II | + | - | - | N | +/- | - | - | N |
| 4-aminoazobenzene-3,4'-disulfonic acid | + | + | + | O | + | - | - | N |
| Sunset Yellow | + | + | + | O | + | - | - | N |
| BF45 | + | - | - | N | + | - | - | N |
| Orange I | + | - | - | N | +/- | - | - | N |
| BF38 | + | - | - | N | + | - | - | N |
| Bordeaux B | + | - | - | N | +/- | - | - | N |
| Ponceau 2G | + | - | - | N | +/- | - | - | N |
| Tartrazine | + | - | - | N | +/- | - | - | N |

Les résultats rapportés dans le tableau IV montrent que les microorganismes peuvent réduire des molécules « azo » s'il y a croissance. Certaines molécules peuvent être réduites par tous les microorganismes testés (exemples : Methyl red) et d'autres sont réduites spécifiquement par une seule espèce (exemple : Methyl orange réduit uniquement par *E. faecalis*). En conséquence, l'activité azoréductase peut être utilisée comme moyen de détection de microorganismes, soit d'un groupe ciblé, soit de façon universelle, selon le choix du composé azo. Dans les cas de l'Orange I, du Ponceau 2G, et de BF 38, la décoloration du substrat permet de visualiser une augmentation de fluorescence. Cette fluorescence est celle des microorganismes. Autrement dit, il s'agit de fluorescence intrinsèque qui existe pour les témoins sans substrat. Elle est quenchée par la coloration du substrat au départ et dévoilée au fur et à mesure de la décoloration du substrat par réduction. Dans ce cas, dans le tableau IV, la fluorescence est notée « – » car ce n'est pas celle du substrat. C'est pour cette raison que l'on observe des cas de décoloration sans augmentation de la fluorescence (tableau IV).

En conclusion, il est possible de détecter la présence de microorganismes par l'utilisation d'un substrat « azo ».

**Exemple 2**

**Tests de réduction sur 24h à 35°C de 3 composés possédant une fonction « azo » par 45 souches représentant 25 espèces de microorganismes.**

On teste, en plaque de microtitration, la réduction de la fonction « azo » des substrats listés dans le tableau V par les 25 espèces listées dans le tableau VI, chacune étant représentée par une ou deux souches.

**Tableau V**

| |
|---|
| 3-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid sel de sodium |
| Tatrazine |
| Orange II |

## Tableaux VI

| espèces Gram - | Nombre de souches |
|---|---|
| *Escherichia coli* | 2 |
| *Cronobacter muytjensii* | 2 |
| *Cronobacter sakazakii* | 2 |
| *Enterobacter cloacae* | 2 |
| *Acinetobacter baumanii* | 2 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 2 |
| *Pseudomonas fluorescens* | 2 |
| *Pseudomonas putida* | 2 |
| *Proteus vulgaris* | 2 |
| *Citrobacter koseri* | 1 |

| espèces Gram + | Nombre de souches |
|---|---|
| *Staphylococcus aureus* | 2 |
| *Staphylococcus epidermidis* | 2 |
| *Staphylococcus saprophyticus* | 2 |
| *Staphylococcus hominis* | 1 |
| *Staphylococcus haemolyticus* | 1 |
| *Kocuria rosea* | 2 |
| *Enterococcus faecalis* | 2 |
| *Enterococcus faecium* | 2 |
| *Streptococcus agalactiae* | 1 |
| *Streptococcus pyogenes* | 1 |

| espèces de levures | Nombre de souches |
|---|---|
| *Candida albicans* | 2 |
| *Candida glabrata* | 2 |
| *Geotrichum candidum* | 2 |
| *Geotrichum capitatum* | 2 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 1 |

Le milieu réactionnel est constitué de :

Bouillon trypcase soja

Substrat 35mg/l

Inoculum 0,5 MacFarland

La réduction du substrat et la croissance des microorganismes sont suivies à l'aide d'un lecteur de microplaque Infinite® M200 TECAN à 35°C sur 24h.

La croissance est suivie par l'absorbance à 660nm, et la réduction des substrats par absorbance et fluorescence aux longueurs d'onde indiquées dans le tableau III, *supra*.

Le substrat est considéré comme réduit par les microorganismes quand la fluorescence est multipliée par 2 par rapport à la fluorescence de base du milieu réactionnel. On marque d'un « + » les souches réduisant le substrat et d'un « - » les souches ne réduisant pas le substrat.

## Tableau VII

| espèces Gram - | 3-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid_ sel de sodium | tartrazine | Orange II |
|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | + | - | - |
| *Escherichia coli* | + | - | - |
| *Cronobacter muytjensii* | + | - | - |
| *Cronobacter muytjensii* | + | - | - |
| *Cronobacter sakazakii* | + | - | - |
| *Cronobacter sakazakii* | + | - | - |
| *Enterobacter cloacae* | + | - | - |
| *Enterobacter cloacae* | + | - | - |
| *Acinetobacter baumanii* | + | - | - |
| *Acinetobacter baumanii* | + | - | - |
| *Pseudomonas aeruginosa* | + | - | - |
| *Pseudomonas aeruginosa* | + | - | - |
| *Pseudomonas fluorescens* | + | - | - |
| *Pseudomonas fluorescens* | + | - | - |
| *Pseudomonas putida* | + | - | - |
| *Pseudomonas putida* | + | + | - |
| *Proteus vulgaris* | + | - | - |
| *Proteus vulgaris* | + | - | - |
| *Citrobacter koseri* | + | - | - |
| **espèces Gram +** | | | |
| *Staphylocossus aureus* | + | - | - |
| *Staphylocossus aureus* | + | - | - |
| *Staphylococcus epidermidis* | + | - | - |
| *Staphylococcus epidermidis* | + | - | - |
| *Staphylococcus saprophyticus* | + | - | - |
| *Staphylococcus saprophyticus* | + | - | - |
| *Staphylococcus hominis* | + | - | - |
| *Staphylococcus haemolyticus* | + | - | - |
| *Kocuria rosea* | + | - | - |
| *Kocuria rosea* | + | - | - |
| *Enterococcus faecalis* | + | + | + |
| *Enterococcus faecalis* | + | + | + |
| *Enterococcus faecium* | + | - | - |
| *Enterococcus faecium* | + | - | - |
| *Streptococcus agalactiae* | + | - | - |
| *Streptococcus agalactiae* | + | - | - |
| *Streptococcus pyogenes* | + | - | - |
| ***espèces levures*** | | | |
| *Candida albicans* | + | - | - |
| *Candida albicans* | - | - | - |
| *Candida glabrata* | + | - | - |
| *Candida glabrata* | - | - | - |
| *Geotrichum candidum* | + | - | - |
| *Geotrichum candidum* | - | - | - |
| *Geotrichum capitatum* | + | - | - |
| *Geotrichum capitatum* | + | - | - |
| *Saccharomyces cerevisiae* | - | - | - |

Les résultats rapportés dans le tableau VII montrent que le 3-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid sel de sodium peut être réduit par toutes les espèces bactériennes testées ainsi que par quelques levures, alors que la Tartrazine et l'Orange II sont réduits principalement par *E. faecalis*.

En conclusion, les molécules « azo » peuvent être utilisées soit pour détecter la présence de tout genre microbien, soit pour détecter la présence de microorganismes spécifiques, soit pour différencier ou caractériser des microorganismes spécifiques.

**Exemple 3**

**Test de réduction du Methyl red par des matrices alimentaires.**

On teste, en plaque de microtitration, 9 matrices alimentaires, dont certaines à forte activité enzymatique (pour lesquels l'usage de TEMPO®TVC n'est pas recommandé), listées dans le tableau VIII, en présence de 35mg/l de Methyl red dans du milieu TSB auquel on ajoute un cocktail antimicrobien associant 200mg/l de chloramphenicol et 6mg/l de gentamycine pour inhiber la croissance des bactéries et des champignons.
Les matrices sont testées à différentes concentrations : 1/400, 1/4000 et 4/40000. Pour cela 10g de matrices sont pesés et dispersés par stomachage dans 90ml de solution Tryptone-Sel ce qui correspond à une dilution de 1/10 à partir de laquelle sont faites les dilutions testées.
La réduction du substrat et la croissance des microorganismes sont suivies à l'aide d'un lecteur de microplaque Infinite® M200 TECAN à 35°C sur 24h.
La réduction du Methyl red est suivie par lecture de la fluorescence avec le couple de longueurs d'onde 250nm/395nm. La croissance potentielle de microorganismes est suivie par lecture de l'absorbance à 660nm. Le sigle « – » signifie qu'il n'y a pas de croissance ou d'augmentation de fluorescence du milieu indiquant une réduction du substrat sur 24h.

En parallèle, les mêmes échantillons avec cocktail antimicrobien sont testés avec le produit TEMPO®TVC (bioMérieux, France), et sur milieu gélosé Columbia dépourvu d'antibiotique.

Le milieu TEMPO®TVC est repris dans 3,9ml d'eau + cocktail antimicrobien auquel on ajoute 100µl de la solution d'échantillon de matrice alimentaire au 1/10. Cette suspension est transférée dans la carte TEMPO® à l'aide du TEMPO® Filler, elle est incubée 40-48 heures à 30 ± 1°C, et la fluorescence est observée avec le TEMPO® Reader.

Sur le milieu gélosé on étale 100µl de la solution d'échantillon de matrice alimentaire au 1/10, correspondant à la quantité d'échantillon contenue dans la concentration 1/400. On dilue la solution d'échantillon de matrice alimentaire de départ au 1/10 deux fois successivement, puis on étale 100µl de chaque solution correspondant aux quantités d'échantillon contenues dans les concentrations 1/4000 et 1/40000 précédemment testées.

**Tableau VIII**

| | TEMPO | Culture | 660nm |
|---|---|---|---|
| Moules + ATB | + | - | - |
| Crevettes roses + ATB | - | - | - |
| Foie de veau cru + ATB | + | + | - |
| Tagliatelles fraîches + ATB | - | - | - |
| Avocat + ATB | + | - | - |
| Melon + ATB | - | - | - |
| Salami + ATB | - | - | - |
| Brie de Meaux AOC + ATB | + | + | - |
| Lait entier microfiltré + ATB | - | - | - |

Le tableau VIII indique la croissance (ou l'absence de croissance) de microorganismes dans les différents échantillons détectée par TEMPO® TVC (TEMPO), par culture sur gélose columbia (Culture) et par lecture de la densité optique à 660nm. Des colonies sont observées pour les échantillons de foie de veau et de brie de Meaux AOC, alors que aucune croissance n'est observée pour ces échantillons en lecture à 660nm. Cette différence peut être due au fait que l'échantillon soit maintenu dans un environnement contenant un cocktail antimicrobien alors que le milieu de culture sur lequel est ensemencé l'échantillon est dépourvu de cocktail antimicrobien.

**Tableau IX**

| | Augmentation de fluorescence sur 24h |
|---|---|
| Moules + ATB | - |
| Crevettes roses + ATB | - |
| Foie de veau cru + ATB | - |
| Tagliatelles fraîches + ATB | - |
| Avocat + ATB | - |
| Melon + ATB | - |
| Salami + ATB | - |
| Brie de Meaux AOC + ATB | - |
| Lait entier microfiltré + ATB | - |

Le tableau IX indique l'absence d'augmentation de fluorescence (-) du milieu contenant la matrice alimentaire en absence de croissance de microorganismes montrant ainsi qu'il n'y a pas de réduction du Methyl red par la matrice alimentaire.
Les résultats rapportés dans le tableau IX indiquent que les matrices testées n'expriment pas d'activité azoréductase capable de dégrader le Methyl red.

L'ensemble de ces résultats indique que les matrices : moules, foie de veau, avocat et brie de Meaux AOC émettent une fluorescence en présence de l'échantillon et du milieu TVC, en l'absence de croissance de microorganismes alors que ce n'est pas le cas avec le substrat Methyl red. On peut donc conclure qu'aucune activité non microbienne d'azoréduction du Methyl red par les matrices alimentaires n'interfère avec la détection de l'activité azoréductase microbienne dans les aliments.

**Exemple 4**

**Test de réduction de l'acide 3-(4-hydroxyphenyl)-azobenzoique par des microorganismes contenus dans des matrices alimentaires.**

On teste 12 matrices alimentaires par 2 milieux : le milieu commercial TEMPO® TVC et le milieu AZO fabriqué au laboratoire qui contient le substrat « azo » acide 3—(4—hydroxyphenyl)-azobenzoique (143,6mg/L) couplé à la 7—amino-4-methyl-coumarine (30,8mg/L) dans du bouillon trypcase soja. Cet exemple utilise un couplage inter-moléculaire entre un substrat azo et une molécule fluorescente. Le

substrat oxydé acide 3—(4—hydroxyphenyl)-azobenzoique coloré en rouge quenche la fluorescence de la 7-amino-4-methylcoumarine. Une fois réduit, l'acide 3-(4-hydroxyphenyl) azobenzoique devient incolore et laisse apparaître la fluorescence de la 7-amino-4-methyl-coumarine. Les 2 milieux sont faits avec et sans cocktail antimicrobien associant 500mg/l de chloramphenicol et 10mg/l de gentamycine pour inhiber la croissance des bactéries et des champignons.

Les matrices sont testées à différentes concentrations : 1/400, 1/4000 et 4/40000. Pour cela 10g de matrices sont pesées et dispersés par stomachage dans 90ml de solution Tryptone-Sel ce qui correspond à une dilution de 1/10 à partir de laquelle sont faites les dilutions testées.

Le produit TEMPO®TVC est repris dans 3,9mL d'eau et le milieu AZO est réparti par aliquot de 3,9mL. On ajoute à chaque milieu 100µL d'échantillon de matrice.

Les cartes TEMPO® sont remplies et mises à incuber à 30°C et lues au bout de 48h par le TEMPO® Reader.

En parallèle une numération sur milieu PCA, qui est la méthode de référence, est faite en UFC/g (UFC signifie Unités Formant Colonies, unité de dénombrement connue de l'homme du métier).

Tableau X

| | Croissance sur milieu PCA + ATB | Croissance sur milieu PCA - ATB |
|---|---|---|
| Viande bovine macreuse | - | + |
| Ravioles du Dauphiné | - | ++ |
| Foie de veau | - | + |
| Rognon de bœuf | - | ++ |
| Pâte à pizza (avec de la levure boulangère) | + | ++ |
| Saint Marcellin - Le Canut | ++ | ++ |
| Amandes (coquillages) | - | + |
| Moules | - | + |
| Pousses de soja haricots Mungo | ++ | ++ |
| Noix de Pécan | - | + |
| Champignons de Paris | - | ++ |
| Mélange de farines boulangères pour pain multi-céréales | - | + |

Tableau XI
Détection de fluorescence par TEMPO® Reader

| | Milieu TVC + ATB | Milieu TVC - ATB | Milieu AZO + ATB | Milieu AZO - ATB |
|---|---|---|---|---|
| Viande bovine macreuse | - | + | - | + |
| Ravioles du Dauphiné | + | + | - | + |
| Foie de veau | + | + | - | + |
| Rognon de bœuf | + | + | - | + |
| Pâte à pizza (avec de la levure boulangère) | - | + | - | + |
| Saint Marcellin - Le Canut | - | + | - | + |
| Amandes (coquillages) | + | + | - | + |
| Moules | + | + | - | + |
| Pousses de soja haricots Mungo | - | + | - | + |
| Noix de Pécan | - | + | - | + |
| Champignons de Paris | + | + | - | + |
| Mélange de farines boulangères pour pain multi-céréales | + | + | - | + |

Le tableau X indique s'il y a croissance sur le milieu PCA indiquant ainsi la quantité de microorganisme contenu dans un gramme de matrice. Le signe « - » signifie <100UFC/gramme, « + » 100<x<1 500 000 UFC/gramme et « ++ » >1 500 000 UFC/gramme. On observe une croissance de microorganismes pour toutes les matrices incubées dans un milieu sans cocktail antimicrobien alors qu'on observe une croissance de microorganismes uniquement pour les matrices pâte à pizza, Saint Marcellin et pousses de soja en présence du cocktail antimicrobien. Ce phénomène est similaire à celui observé à l'exemple 3.

Le tableau XI indique la détection de fluorescence par le lecteur TEMPO® Reader. Une fluorescence est détectée pour toutes les matrices testées excepté la viande bovine macreuse, la pâte à pizza, le Saint Marcellin, les pousses de soja et les noix de Pécan en présence du cocktail antimicrobien alors que aucune fluorescence n'est détectée dans ces conditions pour le milieu AZO. En rapportant aux résultats contenus dans le tableau X, on peut conclure à une interférence matrice-milieu TVC pour les ravioles du dauphiné, le foie de veau, les rognons de bœuf, les amandes, les moules, les champignons de Paris et le mélange de farines boulangères. Cette interférence ne s'observe pas avec le milieu AZO.

Pour les milieux sans cocktail microbien, on observe une croissance et une fluorescence pour toutes les matrices dans tous les milieux. La fluorescence détectée dans le milieu AZO est due à la croissance microbienne.

Ces résultats permettent de conclure que le composé « azo » acide 3—(4—hydroxyphenyl)-azobenzoique n'est pas dégradé par les matrices alimentaires et permet la détection des microorganismes présent dans ces matrices.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de détection, dans un échantillon biologique, d'au moins un microorganisme présentant une activité azoréductase, comprenant les étapes consistant à :
    a) mettre en contact l'échantillon avec un milieu réactionnel comprenant au moins un composé azo ;
    b) incuber ledit milieu réactionnel ; et
    c) détecter la réduction du composé azo par ledit microorganisme, indiquant la présence dudit au moins un microorganisme.

2. Procédé selon la revendication 1 dans lequel l'étape c) permet également un dénombrement.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 dans lequel l'étape c) permet la caractérisation d'au moins un groupe de microorganismes.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 dans lequel la réduction du composé azo est détectée en mesurant une variation d'absorbance ou de fluorescence.

5. Procédé selon la revendication 4 dans lequel l'étape c) correspond à la détection de la disparition d'une coloration.

6. Procédé selon la revendication 4 dans lequel l'étape c) correspond à la détection de l'apparition d'une fluorescence.

7. Procédé selon la revendication 6 dans lequel la réduction du composé azo entraine la suppression d'un phénomène de quenching intramoléculaire.

8. Procédé selon la revendication 6 dans lequel la réduction du composé azo entraine la suppression d'un phénomène de quenching intermoléculaire.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8 dans lequel le milieu comprend au moins un second substrat susceptible de détecter une réaction enzymatique.

10. Procédé selon la revendication 9 dans lequel ledit second substrat est un substrat chromogénique, dont le métabolisme produit une coloration ou une fluorescence.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10 dans lequel le milieu réactionnel est un milieu de culture solide ou liquide.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce qu'il est mis en œuvre dans un contenant sous forme de carte.

13. Procédé selon la revendication 12 dans lequel la carte réactionnelle est une carte VITEK® ou TEMPO®.

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13 dans lequel l'échantillon est une matrice alimentaire.

15. Utilisation d'au moins un composé azo pour la détection d'au moins un microorganisme dans un échantillon.

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement national

FA 762457
FR 1250535

| 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 | | |
| X | CORIGLIANO MARIANA GEORGINA ET AL: "Characterization of the plasmidic or chromosomal cpe gene and metabolic activities in Clostridium perfringens isolates from food in San Luis--Argentina.", CENTRAL EUROPEAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH MAR 2011 LNKD- PUBMED:21526657, vol. 19, no. 1, mars 2011 (2011-03), pages 46-53, XP009159723, ISSN: 1210-7778 * résumé; p.48, alinéa 4 * | 1-15 | C12Q1/06 |
| X | WANG R-F ET AL: "Microarray method to monitor 40 intestinal bacterial species in the study of azo dye reduction", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 20, no. 4, 1 novembre 2004 (2004-11-01), pages 699-705, XP004633817, ISSN: 0956-5663, DOI: 10.1016/J.BIOS.2004.04.011 * résumé; paragraphe 2.3 * | 1-15 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12Q |
| X | I.M. PÉREZ-DÍAZ ET AL: "Modification of azo dyes by lactic acid bacteria", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 107, no. 2, 1 août 2009 (2009-08-01), pages 584-589, XP55028186, ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04227.x * résumé; page 584, col.2, alinéa 2; p.585, col.1, alinéa 4-col.2, alinéa 2 * | 1-15 | |

-/--

| Date d'achèvement de la recherche | Examinateur |
|---|---|
| 30 mai 2012 | Pellegrini, Paolo |

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

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

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

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement national

FA 762457
FR 1250535

| 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 | | |
| X | Wen Zou ET AL: "Azoreductase in Staphylococcus aureus" In: "Current Protocols in Toxicology", 1 janvier 2009 (2009-01-01), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, XP55028135, ISBN: 978-0-47-114085-6 * paragraphe "Basic Protocol 1" * ----- | 1-15 | |

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)

| Date d'achèvement de la recherche | Examinateur |
|---|---|
| 30 mai 2012 | Pellegrini, Paolo |

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

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

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

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)