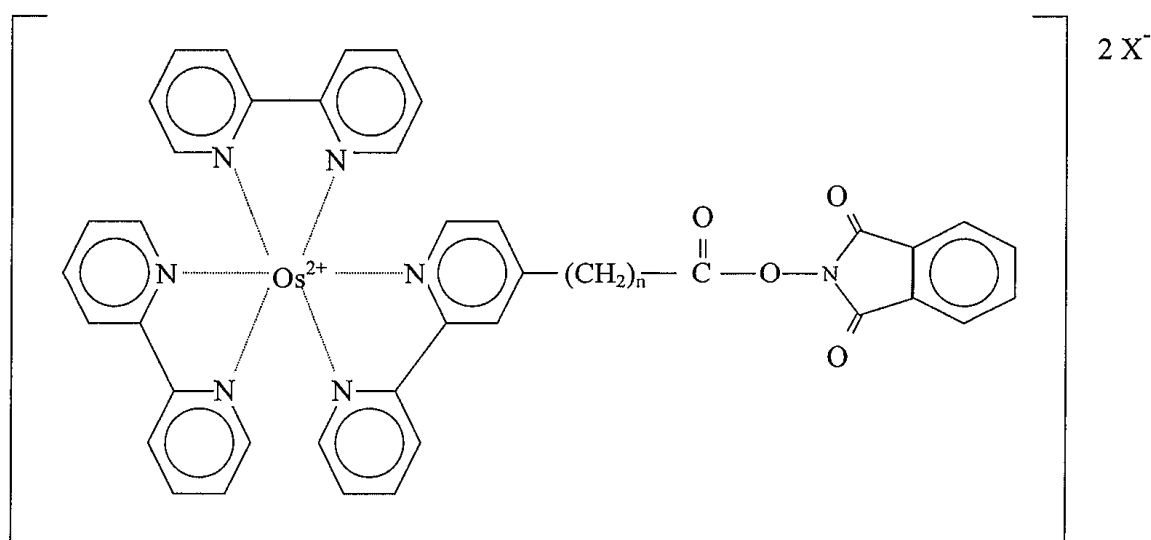


Epreuve d'un candidat

Revendications

1. Complexe d'osmium tris (2,2' – bipyridine) substitué par un ester du N-hydroxysuccinimide ou du N-hydroxyphthalimide avec un acide carboxylique contenant 3 à 8 atomes de carbone.
2. Le complexe d'osmium tris (2,2' bipyridine) substitué par un ester selon la revendication 1 présentant la structure suivante :



où n = 3 ou 4

3. Complexe d'osmium tris (2,2' – bipyridine) substitué par un ester selon la revendication 1 consistant en ester du N-hydroxyphthalimide avec le bis (hexafluorophosphate) d'osmium bis (2,2' – bipyridine) (2,2' bipyridine – 4 – acide butanoïque).
4. Anticorps marqué à l'acide du complexe d'osmium tris (2,2' bipyridine) substitué par un ester selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
5. Anticorps selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est un anticorps monoclonal appartenant à la classe des Immunoglobulines gamma (Ig G) dérivées du lapin.

-
6. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 4 à 5 caractérisé en ce qu'il est doté d'un site de fixation spécifique pour les salmonelles.
 7. Procédé de marquage de l'anticorps selon l'une des revendications 4 à 6, comportant les étapes suivantes :
 - a) on dissout l'anticorps dans un tampon salin à un pH de 8 à 9,5 ;
 - b) on ajoute ladite solution d'anticorps au complexe d'osmium tris (2,2' – bipyridine) substitué par un ester du N-hydroxysuccinimide ou du N-hydroxyphthalimide avec un acide carboxylique contenant 3 à 8 atomes de carbone en solution dans un solvant organique, et on mélange soigneusement les ingrédients ;
 - c) on agite le mélange pendant 5 à 30 minutes ;
 - d) on purifie éventuellement la solution contenant l'anticorps marqué.
 8. Procédé de préparation du complexe d'osmium tris (2,2' – bipyridine) substitué par un ester selon la revendication 1 comprenant les étapes suivantes :
 - a) on fait réagir une osmium dichloro bis (2,2' – bipyridine) avec une 2,2' bipyridine substituée par un acide carboxylique contenant 3 à 8 atomes de carbone ;
 - b) on fait réagir le produit obtenu en a) avec le N-hydroxysuccinimide ou le N-hydroxyphthalimide.
 9. Méthode immunologique pour détecter les salmonelles présentes dans une culture bactérienne ou un échantillon alimentaire contaminé comprenant les étapes suivantes :
 - a) l'échantillon à tester est mis en contact avec une phase solide pendant un premier temps d'incubation suffisant pour que les bactéries soient immobilisées à la surface ou à l'intérieur de ladite phase solide ;
 - b) la phase solide comportant les bactéries immobilisées est soumise à une 1^{ère} étape de lavage visant à enlever les bactéries non liées ;
 - c) la phase solide est mise en contact avec un anticorps marqué à l'aide d'un agent chimioluminescent, ce contact étant maintenu pendant un 2^{ème} temps d'incubation suffisant pour permettre à l'anticorps marqué de se lier aux bactéries ;

d) la phase solide de l'étape c) est soumise à une 2nde étape de lavage pour enlever tout anticorps marqué non lié ;

e) la phase solide obtenue à l'étape d) est amenée à émettre de la lumière, cette lumière émise étant mesurée quantitativement à l'aide d'un dispositif approprié ;

et caractérisée en ce que l'agent chimioluminescent marquant l'anticorps à l'étape c) est un complexe d'osmium tris (2,2' bipyridine) substitué par un ester selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

10. Méthode selon la revendication 9 dans laquelle la phase solide utilisée à l'étape a) est sous forme de bille, de tube, de puits d'une plaque de microtitrage en polystyrène, chlorure de polyvinyle, nylon ou agarose.

11. Méthode selon la revendication 10 dans laquelle la phase solide est constituée d'un puits de microtitrage en polystyrène.

12. Méthode selon l'une des revendications 9, 10 ou 11 dans laquelle l'anticorps de l'étape c) est un anticorps monoclonal appartenant à la classe des Immunoglobulines gamma (Ig G) dérivées du lapin.

13. Utilisation du complexe d'osmium tris (2,2' bipyridine) substitué par un ester selon l'une des revendications 1 à 3 comme marqueur chimioluminescent.

14. Kit de détection des salmonelles dans une culture ou un échantillon alimentaire, comprenant :

a) une phase solide ;

b) un anticorps selon l'une quelconque des revendications 4 à 6 ;

c) une solution aqueuse diluée d'un oxalate de sodium (0,05 M) et du peroxyde d'hydrogène (0,02 M).

Partie Introductive Description

L'invention concerne de nouveaux agents chimioluminescents, les anticorps marqués à l'aide de ces agents ainsi que leur utilisation pour détecter des bactéries impliquées dans les empoisonnements alimentaires.

Les salmonelles sont des bactéries qui constituent, dans le monde industrialisé, une des causes les plus fréquentes d'infections intestinales d'origine alimentaire, avec plus de 40000 cas déclarés aux Etats-Unis chaque année. Le nombre d'infections ayant une issue fatale atteint 1000.

Les salmonelles sont souvent difficiles à détecter. Un échantillon alimentaire soupçonné de contamination salmonellique doit être mis en culture pendant 2 à 3 jours. Un microbiologiste peut alors identifier des salmonelles dans cette culture. Il s'agit toutefois d'une procédure très longue lorsque la concentration bactérienne dans l'échantillon est faible, elle conduit souvent à des résultats négatifs qui sont en réalité faux.

Plusieurs équipes ont récemment cherché à mettre point un test plus rapide et plus fiable pour détecter les salmonelles. Une approche promettant d'être fructueuse réside dans l'utilisation de tests mettant en œuvre des anticorps marqués pour la détection des bactéries. Un anticorps utilisable dans l'invention est une immunoglobuline dotée d'un site de fixation spécifique pour une bactérie. Les anticorps porteurs d'un site de fixation pour les salmonelles se fixent sélectivement à ces bactéries. Le marqueur de l'anticorps est un composé ou un groupe détectable par des moyens chimiques ou spectroscopiques. Le test consiste donc à mettre les salmonelles en contact avec l'anticorps marqué permettant à celui-ci de se lier aux bactéries et de détecter les complexes (anticorps marqués – bactéries) résultants. Cette méthode est très sélective puisque l'anticorps ne se liera qu'aux bactéries visées. Néanmoins, ces tests sont

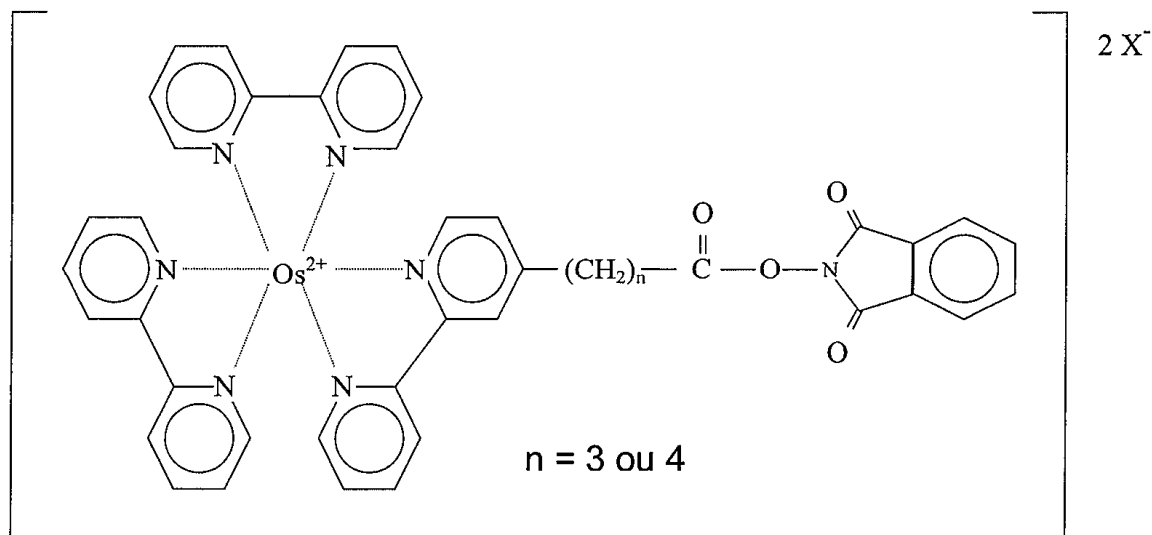
Il est connu de D1 un procédé de détection des salmonelles utilisant des anticorps marqués à l'aide de molécules chimioluminescentes telles qu'un dérivé d'acridinium. Les niveaux de sensibilité atteints par un tel procédé restent toutefois faibles puisque le seuil de détection est de 100 bactéries / ml.

Le document D2 décrit des composés chimioluminescents consistant en complexes d'osmium tris (2,2' bipyridine) substitués ou non par un acide carboxylique qui produisent une lumière d'une grande intensité à bas voltage. Ces agents ne sont pas couplés à des anticorps et aucun test de détection n'est suggéré sur la base d'un éventuel couplage agents chimioluminescents / anticorps. Si bien, qu'aucune suggestion quant aux propriétés luminescentes des agents couplés aux anticorps n'existe.

Le besoin en agents chimioluminescents permettant de rendre les tests immunologiques de détection des salmonelles plus sensibles et rapides persiste encore. C'est ce problème que résout l'invention faisant l'objet de la présente demande de brevet.

Nous avons ~~à présent~~ mis au point un test à sensibilité accrue pour les salmonelles fondé sur l'utilisation d'un complexe d'osmium tris (2,2' – bipyridine) substitué par un ester du N-hydroxysuccinimide ou du N-hydroxyphthalimide avec un acide carboxylique contenant 3 à 8 atomes de carbone, comme marqueur chimioluminescent. Un composé chimioluminescent est un composé qui émet de la lumière suite à une réaction chimique. Cette lumière peut être détectée.

Pour qu'il puisse faire d'office de marqueur, l'agent chimioluminescent doit être un complexe d'osmium tris 2,2' bipyridine substitué par un groupe de liaison apte à lier le complexe à l'anticorps. Nous avons trouvé qu'il était essentiel, dans le cadre de la présente invention, d'utiliser en tant que groupe de liaison un ester du N-hydroxysuccinimide ou du N-hydroxyphthalimide avec un acide carboxylique contenant de 3 à 8 atomes de carbones. Un complexe d'osmium tris (2,2' – bipyridine) comportant un tel groupe de liaison peut être préparé en faisant réagir d'abord une osmium dichloro bis (2,2' – bipyridine) avec une 2,2' – bipyridine substituée par un acide carboxylique (cette première étape du schéma réactionnel mis en œuvre pour préparer le marqueur est publiée dans J. Complex Chem. Vol. 66, (1953), 44), ce qui conduit à obtenir un complexe tris (2,2' – bipyridine) substitué par un acide carboxylique. Le marqueur est obtenu en faisant réagir, dans une seconde étape, ce complexe tris (2,2' – bipyridine) substitué par un acide carboxylique avec le N-hydroxysuccinimide ou le N-hydroxyphthalimide, ce qui conduit au complexe tris (2,2' – bipyridine) substitué par l'ester. Un groupe particulièrement préféré de composés utilisés comme marqueurs présente la structure suivante :



nous proposons une méthode immunologique pour détecter les salmonelles présentes dans une culture bactérienne ou un échantillon alimentaire contaminé, cette méthode comprenant les étapes suivantes :

- a) l'échantillon à tester est mis en contact avec une phase solide pendant un premier temps d'incubation suffisant pour que les bactéries soient immobilisées à la surface ou à l'intérieur de ladite phase solide ;*
- b) la phase solide comportant les bactéries immobilisées est soumise à une première étape de lavage visant à enlever les bactéries non liées ;*
- c) la phase solide lavée est mise en contact avec un anticorps marqué à l'aide d'un agent chimioluminescent comprenant un complexe d'osmium tris (2,2' – bipyridine) ~~ce~~ selon l'invention, ce contact étant maintenu pendant un deuxième temps d'incubation suffisant pour permettre à l'anticorps marqué de se lier aux bactéries ;*
- d) la phase solide de l'étape c) est soumise à une seconde étape de lavage pour enlever tout anticorps marqué lié ;*
- e) la phase solide obtenue à l'étape d) est amenée à émettre de la lumière, cette lumière étant mesurée quantitativement à l'aide d'un dispositif approprié.*

La méthode selon la présente invention met de préférence en œuvre à l'étape a) une phase solide ayant la forme d'une bille, d'un tube ou d'un puits de plaque de microtitrage, celle-ci étant en polystyrène, en chlorure de polyvinyle, en nylon ou en agarose. La préférence va tout particulièrement à une phase solide constituée d'un puits de plaque de microtitrage en polystyrène.

Le premier temps d'incubation aura normalement une durée comprise entre 15 minutes et 3 heures, préférentiellement entre 20 minutes et 2 heures 30 minutes. La température, pendant la première incubation, sera préférentiellement maintenue dans la plage de 20°C à 40°C. En règle générale, l'incubation est mise en œuvre en présence d'un tampon, qui est de préférence un tampon salin donnant un pH entre 8,0 et 9,5.

Généralement, les étapes de lavage décrites aux points b) et d) sont chacune mises en œuvre par utilisation d'un tampon, de préférence un tampon salin donnant également un pH entre 8,0 et 9,5.

Le deuxième temps d'incubation mis en œuvre à l'étape c) de notre procédé (exposition de l'anticorps marqué aux bactéries immobilisées à la surface ou à l'intérieur de la structure de la phase solide) varie généralement entre 15 minutes et 3 heures, de préférence entre 20 minutes et 2 heures 30 minutes. La température mise en œuvre est préférentiellement dans le domaine de 20°C à 40°C. Cette étape est généralement mise en œuvre en présence d'un tampon qui est de préférence un tampon salin donnant un pH entre 8,0 et 9,5.

Dans l'étape finale e), de la méthode selon l'invention, l'anticorps marqué lié aux bactéries à détecter subit une réaction conduisant à l'émission de lumière. Une solution d'activation est mise en contact avec les anticorps marqués liés aux bactéries. Ceci amène le complexe d'osmium à émettre de la lumière. La solution d'activation est typiquement constituée par une solution aqueuse d'oxalate de sodium (0,05 M) et de peroxyde d'hydrogène (0,02 M). L'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la concentration en complexe d'osmium, et par conséquent au nombre de bactéries présentes. L'intensité de la lumière émise peut être mesurée à l'aide d'un luminomètre. Le nombre de bactéries dans l'échantillon

est proportionnelle aux unités de lumière relative (RLU) qu'indique le luminomètre. Un échantillon hautement contaminé par les salmonelles donnera un RLU élevé tandis qu'un échantillon négatif donnera un RLU très faible.

L'anticorps utilisé au point c) est un anticorps qui se fixe aux salmonelles avec une spécificité suffisante pour permettre un test utile. On donne la préférence à un anticorps monoclonal appartenant à la classe des protéines appelées immunoglobulines gamma (IgG) dérivées du lapin. L'anticorps peut être préparé par des techniques connues en elles-mêmes et est disponible dans le commerce.

L'anticorps choisi est marqué à l'aide d'un agent chimioluminescent qui est un complexe d'osmium tris (2,2' – bipyridine) selon l'invention.

Un schéma approprié pour marquer l'anticorps avec le complexe d'osmium tris (2,2' – bipyridine) selon l'invention comporte les étapes suivantes :

- on dissout l'anticorps dans un tampon salin à un pH de 8 à 9,5 ;*
- on ajoute ladite solution d'anticorps au marqueur (c'est-à-dire au complexe d'osmium substitué par le groupe de liaison) en solution dans un solvant organique, et on mélange soigneusement les ingrédients ;*
- on agite le mélange pendant 5 à 30 minutes ;*
- on purifie éventuellement la solution contenant l'anticorps marqué.*

Le test relatif aux salmonelles peut être fourni sous la forme d'un kit pour la détection des bactéries salmonelles dans une culture ou dans un échantillon alimentaire, ce kit comprenant :

- une phase solide, de préférence sous la forme d'un puits de plaque de microtitrage ;*
- un anticorps (de préférence un anticorps monoclonal de type IgG) marqué par couplage avec un complexe d'osmium tris (2,2' – bipyridine) selon l'invention ;*
- une solution aqueuse diluée d'un oxalate de sodium (0,05 M) et du peroxyde d'hydrogène (0,02 M).*

Les exemples suivants illustrent encore mieux l'invention et ses avantages, étant entendu qu'ils sont donnés uniquement à titre illustratif et en aucun cas limitatif.

[Exemples I à V]