

# EXAMEN EUROPEEN DE QUALIFICATION 2005

## EPREUVE A CHIMIE

Cette épreuve contient :

- |   |                                |                    |
|---|--------------------------------|--------------------|
| * | Lettre du demandeur            | 2005/A(Ch)/f/1-10  |
| * | Document 1 (état de technique) | 2005/A(Ch)/f/11-18 |
| * | Document 2 (état de technique) | 2005/A(Ch)/f/19-21 |

## **LETTRE DU DEMANDEUR**

Montezuma PLC a travaillé sur de nouveaux tests de détection de bactéries impliquées dans les empoisonnements alimentaires. Nos expériences ont dégagé des résultats très intéressants que nous croyons valoir la peine d'être brevetés. Nous vous demandons de déposer une demande de brevet couvrant nos travaux de la façon la plus complète possible.

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 40 000 cas déclarés aux États-Unis chaque année. Le nombre d'infections ayant une issue fatale atteint 1 000.

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 au 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 oeuvre 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 toujours peu sensibles et ils ne donnent un résultat positif que si l'échantillon testé présente une concentration élevée en bactéries.

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) comme marqueur chimioluminescent. Un composé chimioluminescent est un composé qui émet de la lumière suite à une réaction chimique. Cette lumière peut être détectée.

En particulier 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 la dite 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 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 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.

La méthode selon la présente invention, met de préférence en oeuvre à l'étape a) une phase solide ayant la forme d'une bille, d'un tube ou d'un puits d'une 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, préférablement entre 20 minutes et 2 heures 30 minutes. La température, pendant la première incubation, sera préférablement maintenue dans la plage de 20 °C à 40 °C. En règle générale, l'incubation est mise en oeuvre en présence d'un tampon, qui est de préférence un tampon salin donnant un pH entre 8,0 et 9,5.

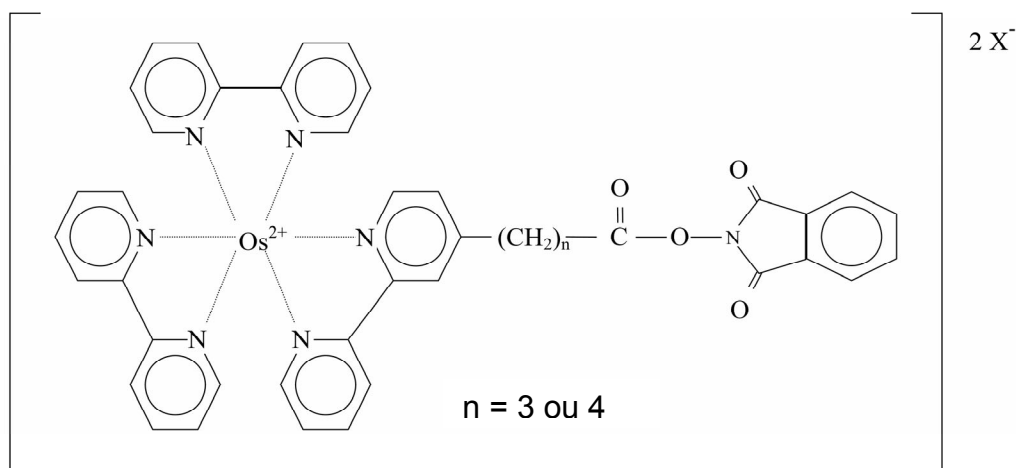
Généralement, les étapes de lavage décrites aux points b) et d) sont chacune mises en oeuvre par utilisation d'un tampon, de préférence un tampon salin donnant également un pH entre 8,0 et 9,5.

Le deuxième temps d'incubation mis en oeuvre 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 oeuvre est préférentiellement dans le domaine de 20 °C à 40 °C. Cette étape est généralement mise en oeuvre 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). Ces complexes d'osmium sont des agents chimioluminescents bien connus. Le complexe en tant que tel ne se fixe pas aux anticorps et ne constitue donc pas un marqueur approprié. Pour qu'il puisse faire office de marqueur, le complexe doit être 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 oeuvre 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 :



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

- on dissout l'anticorps dans un tampon salin à un pH de 8,0 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 une durée de 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) ;
- 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.

## EXEMPLE I

**Préparation du bis(hexafluorophosphate) d'osmium bis (2,2'-bipyridine) (2,2'-bipyridine-4-acide butanoïque) décrit dans J. Complex Chem. Vol. 66, (1953), 44).**

On mélange sous agitation dans un mélange de méthanol (20 ml) et d'eau (5 ml) et au reflux pendant 9 heures du bicarbonate de sodium (0,40 g), de l'osmium dichloro bis(2,2'-bipyridine) (0,40 g), et de l'acide 2,2'-bipyridine-4-butanoïque (0,30 g). La solution résultante est refroidie au bain de glace, traitée avec 5 gouttes d'acide sulfurique concentré et maintenue à la température de la glace pendant 1 heure et demie. Il se forme un précipité qui est séparé par filtration et lavé avec du méthanol (8 ml).

L'ensemble constitué par le filtrat et la solution de lavage est traité avec une solution d'hexafluorophosphate de sodium (5,0 g) dans de l'eau (25 ml). On refroidit la solution obtenue au bain de glace pendant 3 heures et on récupère par filtration le précipité résultant de cristaux rouge-pourpre (0,40 g).

## EXEMPLE II

**Préparation de l'ester du N-hydroxyphthalimide avec le bis(hexafluorophosphate) d'osmium bis(2,2'-bipyridine) (2,2'-bipyridine-4-acide butanoïque).**

On dissout, en agitant, du dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 0,046 g) et du N-hydroxyphthalimide (0,034 g) dans du diméthylformamide (DMF, 2 ml) et on refroidit le tout au bain de glace. On ajoute le bis(hexafluorophosphate) de l'osmium bis(2,2'-bipyridine) (2,2'-bipyridine-4-acide butanoïque) (0,101 g, préparé selon l'exemple I) en solution dans le DMF (1 ml), et on agite le mélange pendant 5 heures à la température du bain de glace. Il se forme un précipité que l'on sépare par centrifugation. Le surnageant, qui contient l'ester du complexe d'osmium, est conservé et utilisé comme marqueur.

### **EXEMPLE III**

#### **Préparation de l'anticorps**

On utilise un anticorps monoclonal IgG anti-salmonelles. Cet anticorps a été préparé de façon en elle-même connue sous forme d'une solution pure.

#### **Marquage de l'anticorps monoclonal IgG anti-salmonelles (IgG) avec le complexe d'osmium**

La solution d'ester du N-hydroxyphthalimide avec le bis(hexafluorophosphate) d'osmium bis(2,2'-bipyridine) (2,2'-bipyridine-4-acide butanoïque) préparée à l'exemple II (1 ml) est ajoutée, sous agitation, à une solution saline physiologique tamponnée contenant l'IgG (PBS, 5 ml ; pH = 9,0 ; quantité de 25 mg/ml IgG). Le mélange est agité pendant 20 minutes, et le précipité est éliminé par centrifugation. On récupère le surnageant qui contient l'IgG marqué par le complexe d'osmium.

On teste le résultat du marquage en dialysant, avec de la solution PBS, la solution d'IgG marqué à l'osmium. Comme contrôle, le complexe d'osmium activé non lié à l'anticorps (exemple II) est également dialysé avec de la solution PBS. Après 8 heures, le contrôle ne montre aucune fluorescence dans le tube à dialyse. En revanche, la solution contenant l'IgG marqué à l'osmium se caractérise par une forte fluorescence, preuve que le complexe d'osmium est lié à l'IgG.

## EXEMPLE IV

### Détection des salmonelles

On applique la méthodologie suivante :

- a) un échantillon contenant des salmonelles est introduit dans les puits d'une plaque de microtitrage en polystyrène (0,1 ml/puits). On incube pendant 30 minutes à 37 °C en présence de tampon Tris, de pH 9 ;
- b) on lave ensuite la plaque de microtitrage 5 fois avec un tampon PBS de pH 9,0, contenant 0,05% de tensio-actif Tween 20 (monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane) ;
- c) on ajoute l'anticorps marqué au complexe d'osmium (2,2'-bipyridine) (préparation selon l'exemple III) à raison de 0,1 ml/puits, et on incube pendant 30 minutes à 37 °C en présence d'un tampon Tris de pH 9,2 ;
- d) on lave la plaque comme à l'étape b) ci-dessus et
- e) on mesure la luminescence avec un luminomètre LB96P qui ajoute automatiquement une solution aqueuse d'oxalate de sodium (0,05 M) et du peroxyde d'hydrogène (0,02 M) à chacun des puits de la plaque.

La procédure est répétée avec des anticorps marqués à l'aide d'un certain nombre d'autres marqueurs fluorescents commercialement disponibles, et la sensibilité des anticorps marqués est comparée. Chaque anticorps marqué est testé dans un puit de contrôle ayant subi le même traitement que ci-dessus, mais sans contamination bactérienne. Tout signal ayant une intensité en RLU supérieure d'au moins 20% au contrôle est considéré comme positif. Une série d'échantillons comportant un nombre connu de bactéries a été testée et la concentration bactérienne la plus faible pouvant être détectée est déterminée pour chacun des marqueurs.

Marqueur utilisé	Seuil de détection (bactéries/ml)
Ester du N-hydroxyphthalimide avec le bis(hexafluorophosphate) d'osmium bis(2,2'-bipyridine) (2,2'-bipyridine-4-acide butanoïque)	10
Ester d'acridinium	100
Fluorescillium	700
Bacdetect	400
Glowdark	3 000

### EXEMPLE V

Un échantillon d'un aliment (viande de boeuf hachée) est volontairement contaminé avec des salmonelles. La viande hachée est divisée en portions de 25 g et mélangée avec un volume égal de tampon Tris de pH 9,2. Un nombre déterminé de bactéries est ajouté à chaque échantillon, puis les échantillons sont bien agités et mis en culture pendant 4 heures à 37 °C. Les cultures sont filtrées à travers une membrane ayant des pores de 10 micromètres, afin de séparer la viande de boeuf des bactéries et le liquide obtenu est testé au moyen de l'anticorps marqué obtenu à l'exemple II, et en suivant la procédure de l'exemple IV.

Tous les échantillons ont donné des résultats positifs. Tous les tests commercialement disponibles exigent que les échantillons soient mis en culture pendant au moins 24 heures. Par conséquent notre test peut considérablement réduire le temps nécessaire pour tester des échantillons d'aliments.

Salutations,

D. Belly,

Développement des produits

Montezuma PLC

**DOCUMENT 1 (état de la technique)**

PROCÉDÉ DE DÉTECTION DE BACTÉRIES

- 5 L'invention est relative à un nouveau procédé pour détecter des salmonelles dans une culture ou un échantillon contaminé d'aliment.

L'invention met en oeuvre un test utilisant des anticorps marqués à l'aide de molécules chimiluminescentes pour mesurer la quantité de bactéries présentes. L'invention vise  
10 également des kits pour effectuer des tests selon le procédé.

Les salmonelles existent dans nombre d'environnements mais constituent le plus grand danger pour la santé quand elles sont présentes dans la nourriture et les produits alimentaires. La volaille, les viandes et les oeufs sont des sources habituelles de  
15 salmonelles. Quand les bactéries sont absorbées elles peuvent rester dans les intestins et y proliférer, entraînant ainsi, plusieurs jours après l'ingestion, des symptômes cliniques tels que des vomissements, la diarrhée et des nausées et, dans les cas graves, ces symptômes peuvent entraîner la mort. Il est donc hautement désirable de fournir des tests permettant de détecter des bactéries dangereuses. Des tests pour  
20 salmonelles sont connus. Toutefois ces tests sont caractérisés par des niveaux de sensibilité qu'il serait nécessaire d'améliorer.

## DESCRIPTION DE L'INVENTION

Selon l'un de ses aspects, l'invention fournit un procédé de détection des salmonelles dans une culture ou un échantillon contaminé d'aliment, comprenant les étapes

5 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 sur la phase solide ;

10 b) la phase solide comprenant les bactéries immobilisées est soumise à une première étape de lavage pour éliminer les bactéries non liées ;

c) la phase solide lavée est mise en contact avec un anticorps spécifique qui est marqué par couplage à un agent chimioluminescent comprenant un dérivé d'acridinium, ce contact étant réalisé pendant un second temps d'incubation suffisant pour permettre à l'anticorps marqué de se fixer sur les bactéries ;

15 d) la phase solide de l'étape c) est soumise à une seconde étape de lavage visant à éliminer tout anticorps non fixé, et

e) la phase solide obtenue à l'étape d) est amenée à émettre de la lumière qui est mesurée quantitativement à l'aide d'un dispositif approprié.

20 La présente invention fournit une méthode qui est mise en oeuvre en utilisant, au point a), une phase solide sous la forme d'une bille, d'un tube ou d'un puits d'une plaque de microtitrage et qui peut être à base de polystyrène, de chlorure de polyvinyle, de nylon, de billes d'agarose ou de dérivés cellulosiques.

25 La phase solide préférée est un puits d'une plaque de microtitrage en polystyrène.

Le contact de l'échantillon qui comprend les bactéries à détecter avec la phase solide (premier temps d'incubation) peut varier entre 15 minutes et 3 heures, à une température allant de 20 à 40 °C, et elle aura habituellement lieu en présence d'un tampon salin donnant un pH de 8,3 à 9,5.

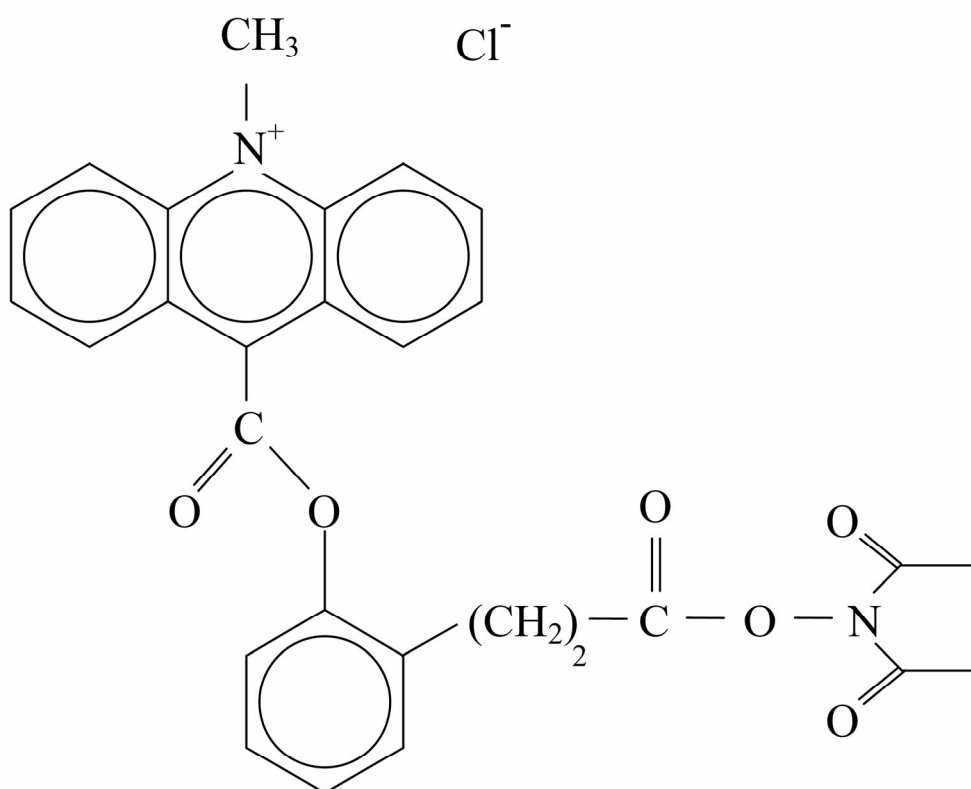
5

En général, les étapes de lavage décrites aux points b) et d) s'effectuent chacune en utilisant un tampon salin donnant également un pH de 8,3 à 9,5.

10 À l'étape c), le contact de l'anticorps marqué avec les bactéries immobilisées sur la phase solide (second temps d'incubation) peut varier entre 15 minutes et 3 heures, dans un domaine de température de 20 °C à 40 °C, et généralement en présence d'un tampon salin donnant un pH de 8,3 à 9,5.

15 A la dernière étape, au point e), on ajoute, aux bactéries marquées sur la phase solide, une solution d'activation qui peut être une solution aqueuse diluée d'oxalate de sodium (0,05 M) et de peroxyde d'hydrogène (0,02 M). On amène ainsi le marqueur d'acridinium à émettre de la lumière. Le nombre de bactéries présentes peut être déterminé en mesurant l'intensité de la lumière émise au moyen d'un luminomètre. La concentration en molécules d'acridinium, qui est proportionnelle au nombre de bactéries, peut être  
20 déterminée grâce aux unités de lumière relative (RLU) enregistrées par le luminomètre. Un échantillon fortement contaminé aura un nombre de RLU élevé tandis qu'un échantillon négatif aura un nombre de RLU très bas.

L'anticorps utilisé au point c) est un anticorps qui se lie aux salmonelles avec une spécificité suffisante pour permettre un dosage utilisable. L'anticorps utilisé est préférentiellement un anticorps appartenant à la classe des protéines appelées immunoglobulines gamma (IgG) provenant du lapin. L'anticorps peut être préparé par des techniques conventionnelles en elles-mêmes connues. L'anticorps choisi est marqué à l'aide d'un agent chimioluminescent sélectionné parmi les dérivés d'acridinium. De préférence, le marquage se fera au moyen d'un dérivé d'acridinium consistant en un ester phényle substitué de l'acide 10-méthylacridinium-9-carboxylique, correspondant à la formule (1) ci-dessous :



10

Les esters d'acridinium de formule (1) utilisés pour mettre en oeuvre le procédé selon l'invention sont des composés connus dont la préparation est décrite dans le document EP-A-0082 636.

Un schéma général pour marquer l'anticorps avec le dérivé d'acridinium implique la méthodologie suivante :

- on dissout l'anticorps dans un tampon salin à un pH de 2 ;
- on ajoute la solution d'anticorps au marqueur éventuellement en solution dans un solvant organique, puis on mélange soigneusement ;
- on maintient le mélange dans l'obscurité à une température de 20 à 30 °C pendant 5 à 30 minutes ;
- on purifie ensuite facultativement l'anticorps marqué pour éliminer l'excès de marqueur par chromatographie par perméation sur gel.

10

Selon un autre aspect l'invention fournit un kit pour détecter les salmonelles présentes dans une culture ou un échantillon contaminé d'aliment, le dit kit comprenant :

- une phase solide, de préférence sous la forme d'un puits d'une plaque de microtitrage soit d'une membrane ;
- un anticorps marqué par couplage avec un dérivé d'acridinium ;
- une solution aqueuse d'oxalate de sodium (0,05 M) et du peroxyde d'hydrogène (0,02 M).

15

Les exemples qui suivent sont uniquement illustratifs et nullement limitatifs et sont donnés pour illustrer la présente invention et ses avantages.

20

## EXEMPLE I

### Préparation d'anticorps marqués à l'aide d'un dérivé d'acridinium

- 5 On utilise un anticorps IgG anti-salmonelle. Cet anticorps a été préparé sous forme de solution par une méthode en elle-même connue.

Le dérivé d'acridinium utilisé est le composé représenté par la formule (1).

- 10 La réaction de marquage à l'acridinium est mise en oeuvre comme suit :
1. on dissout l'anticorps (50 microgrammes de IgG) dans 0,2 ml de tampon marqueur (phosphate de sodium à 0,2 M de pH = 2) ;
  2. on ajoute la solution d'anticorps à 5 microgrammes de marqueur à l'acridinium, et on mélange soigneusement ;
  - 15 3. on incube le mélange pendant 15 minutes à la température ambiante (25 °C), dans l'obscurité ;
  4. on charge le mélange sur une colonne de 10 ml de Sephadex G25M et on récupère 15 fractions (de 1 ml). Comme tampon d'élution et de stockage, on pourra utiliser une solution tampon saline au phosphate (0,1 M, pH 6,3, et 0,15 M de NaCl)
  - 20 contenant 0,05 % (poids/volume) d'azide de sodium et 0,1 % (poids/volume) d'albumine sérique bovine ;
  5. on retire une partie aliquote (0,01 ml) de chaque fraction et on mesure l'activité à l'aide d'un luminomètre ;
  6. on réunit les fractions actives et on stocke les anticorps marqués à l'acridinium
  - 25 à -20 °C.

## EXEMPLE II

### Détection de salmonelles à l'aide du procédé selon l'invention

- 5 On a utilisé la méthodologie suivante :
- a) un échantillon (dont la concentration en salmonelles est connue) est introduit à raison de 0,1ml/puits dans les puits d'une plaque de microtitrage en polystyrène. On incube pendant 30 minutes à 37 °C en présence d'un tampon Tris, de pH 9,2 ;
  - b) la plaque de microtitrage est ensuite lavée 5 fois avec un tampon PBS, de pH 9,0, contenant 0,05% de tensio-actif Tween 20 (monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane) ; c) l'anticorps marqué à l'acridinium est introduit dans chaque puits et incubé pendant 30 minutes à 37 °C en présence d'un tampon Tris de pH 9,2;
  - d) la plaque est lavée comme à l'étape b) ; puis
  - e) la luminescence est mesurée à l'aide d'un luminomètre LB96P qui introduit  
15 automatiquement une solution aqueuse d'oxalate de sodium (0,05 M) et du peroxyde d'hydrogène (0,02 M) dans chaque puits de la plaque.

20 Par le présent procédé il est possible de détecter des salmonelles à une concentration de 100 cellules/ml, ce qui représente une sensibilité supérieure à celle de tous les tests actuellement disponibles commercialement pour cette bactérie.

## REVENDICATIONS

1. Procédé pour détecter des salmonelles présentes dans une culture ou un échantillon contaminé d'aliment, comprenant les étapes suivantes :
  - 5 a) mettre l'échantillon à tester en contact avec une phase solide, pendant un premier temps d'incubation suffisant pour permettre d'immobiliser les bactéries sur la phase solide ;
  - b) soumettre la phase solide comportant les bactéries immobilisées à une première étape de lavage pour éliminer les bactéries non fixées ;
  - 10 c) mettre en contact la phase solide lavée avec un anticorps spécifique qui est marqué par couplage avec un agent chimioluminescent comprenant un dérivé d'acridinium, cette mise en contact étant mise en oeuvre au cours d'un second temps d'incubation suffisant pour permettre à l'anticorps marqué de se fixer à la bactérie ;
  - 15 d) soumettre la phase solide de l'étape c) à une deuxième étape de lavage pour éliminer tout anticorps marqué non fixé ;
  - e) amener la phase solide obtenue à l'étape d) à émettre de la lumière et mesurer la lumière quantitativement au moyen d'un dispositif approprié.
  
- 20 2. Kit pour détecter les salmonelles présentes dans une culture ou un échantillon contaminé d'aliment, comprenant :
  - une phase solide ;
  - un anticorps de type IgG marqué par couplage avec un dérivé d'acridinium ; et
  - une solution aqueuse diluée d'oxalate de sodium (0,05 M) et du peroxyde  
25 d'hydrogène (0,02 M).

## **DOCUMENT 2 (état de la technique)**

Les dispositifs émettant de la lumière (LED) sont utiles dans nombre d'applications. Les LED sont constitués d'une couche d'un composé chimioluminescent disposé entre deux électrodes sandwich, dont l'une au moins est transparente. Un courant est appliqué à la couche par l'intermédiaire des électrodes. Ceci amène le composé à émettre de la lumière. On cherche des composés chimioluminescents qui produisent une lumière d'une grande intensité à bas voltage. Parmi les matériaux qui ont été examinés, les complexes d'osmium ont récemment suscité une attention considérable.

10

### RÉSUMÉ DE L'INVENTION

La présente invention fournit un procédé pour préparer des LED à luminosité de haute intensité à bas voltage. Elles sont à base d'une pellicule de composés organiques luminescents choisis parmi les complexes d'osmium tris(2,2'-bipyridine) substitués ou non par un acide carboxylique.

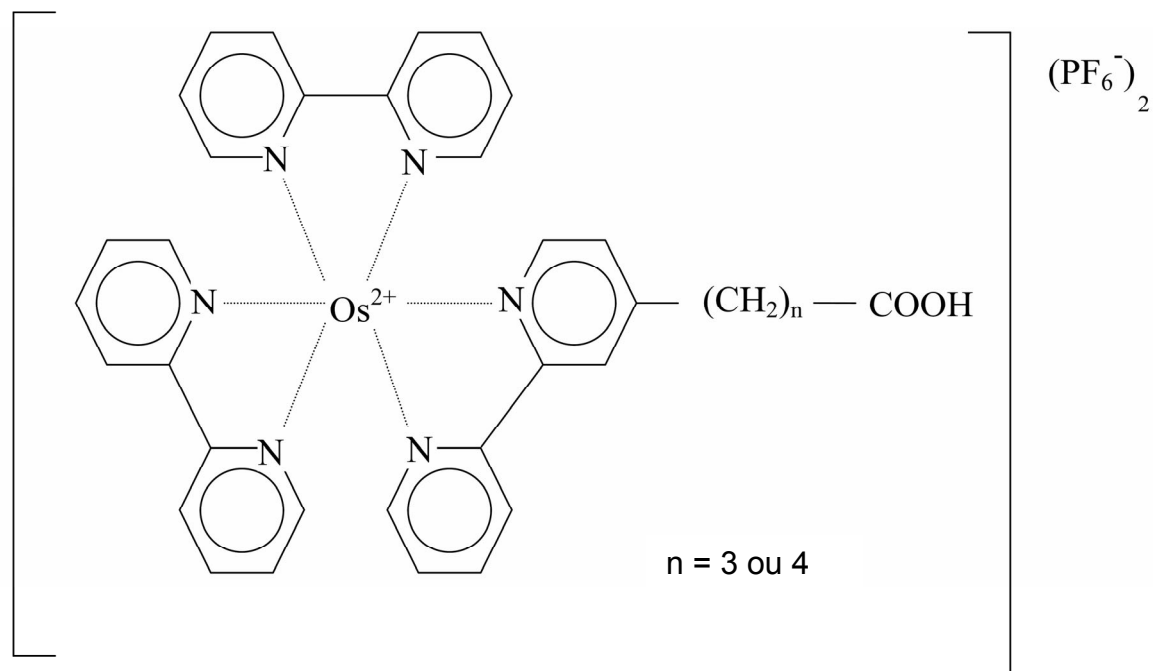
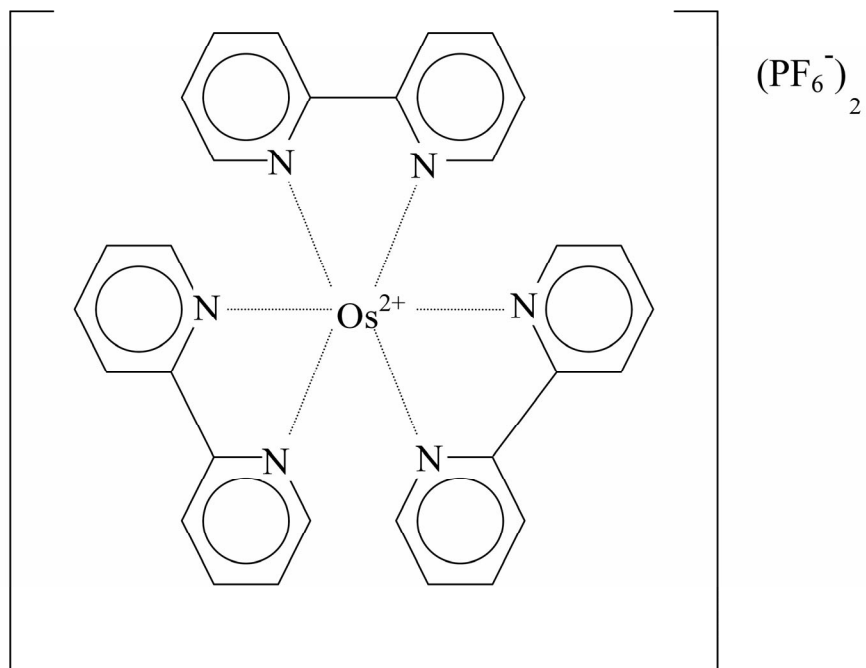
15

### DESCRIPTION DES MODES DE RÉALISATION PRÉFÉRENTIELS

Les inventeurs ont trouvé que l'utilisation de complexes d'osmium tris(2,2'-bipyridine) comme composés organiques conduisent à des LED ayant les caractéristiques recherchées. Des résultats particulièrement bons ont été obtenus lorsque le complexe d'osmium est choisi parmi les sels suivant : le bis(hexafluorophosphate) du tris(2,2'-bipyridine) osmium, le bis(hexafluorophosphate) du bis(2,2'-bipyridine) (2,2'-bipyridine-4 acide pentanoïque) osmium, ou le bis(hexafluorophosphate) du bis(2,2'-bipyridine) (2,2'-bipyridine-4 acide butanoïque) osmium.

25

La structure chimique de ces complexes d'osmium est comme suit :



Ces complexes peuvent être synthétisés en utilisant la méthode décrite dans J. Complex Chem. Vol. 66, (1953), 44).

## Préparation du dispositif luminescent

Par pulvérisation cathodique on revêt une plaque de verre d'une couche d'oxyde d'indium-étain (ITO) de 5 micromètres d'épaisseur. Cette couche constitue une anode  
5 transparente. Une pellicule mince (environ 100 nm d'épaisseur) de sel de bis(hexafluorophosphate) de tris(2,2'-bipyridine)osmium est appliquée par centrifugation sur le substrat d'oxyde d'indium-étain (ITO) à partir d'une solution à 4 % dans l'acétonitrile, à température ambiante. La pellicule est chauffée pendant au moins 8 heures à 125 °C dans une étuve sous vide. Des cathodes en aluminium sont ensuite  
10 appliquées à la surface des pellicules, à la température ambiante. L'anode et la cathode sont chacune électriquement raccordées par soudure à un mince fil de cuivre.

## Caractérisation du LED

15 Les caractéristiques luminosité/voltage du LED ont été mesurées à la température ambiante.

Le LED fabriqué comme décrit ci-dessus a fourni, sous un voltage de 3,0 V, une émission rouge vif nettement perceptible dans une salle éclairée. Une émission similaire  
20 a été obtenue avec un LED dans lequel une couche de sel du bis(hexafluorophosphate) de bis(2,2'-bipyridine) (2,2'-bipyridine-4 acide butanoïque) osmium était utilisée comme couche luminescente. Ces résultats montrent que les présentes LED font preuve d'une excellente luminosité à bas voltage.

## 25 REVENDEICATION

1. Dispositif LED émettant de la lumière de haute intensité lumineuse sous bas voltage, sous forme d'un film organique mince comprenant une couche organique émettant de la lumière et constituée de complexes tris(2,2'-bipyridine) osmium substitués ou  
30 non par un acide carboxylique.