(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** ***3 036 708***

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

(21) **N° d'enregistrement national :** **15 54922**

(51) Int Cl[8] : ***C 12 N 13/00*** *(2016.01), C 02 F 1/48*

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 30.05.15.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 02.12.16 Bulletin 16/48.

(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 :**

( ) **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE 1 Etablissement public* — FR et *KALLISTE Société par actions simplifiée* — FR.

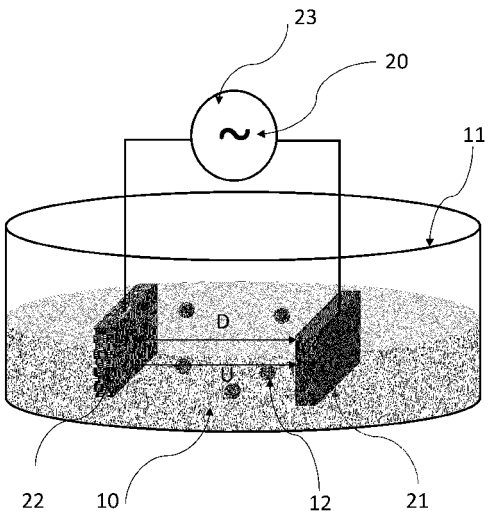
(72) **Inventeur(s) :** XAVIER PASCAL, ANGELIDIS JEAN, CHAMBEROD ERIC, RAULY DOMINIQUE, MARTINS JEAN, VINCE ERWANN, BELBACHIR HAKIMA et PAIN XAVIER.

(73) **Titulaire(s) :** UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE 1 Etablissement public, KALLISTE Société par actions simplifiée.

(74) **Mandataire(s) :** INNOVATION COMPETENCE GROUP.

(54) PROCEDE D'INHIBITION DU DEVELOPPEMENT DE MICROORGANISMES.

(57) L'invention concerne un dispositif et un procédé permettant l'inhibition du développement de microorganismes, tels des bactéries, dans un milieu, et en particulier un milieu liquide. Plus précisément, le procédé comprend l'application d'une tension de polarisation au milieu liquide, la fréquence de ladite tension variant, dans un intervalle temporel inférieur à 1 heure, entre une fréquence minimale et une fréquence maximale, la fréquence maximale étant au moins deux fois supérieure à la fréquence minimale.



FR 3 036 708 - A1

Procédé d'inhibition du développement de microorganismes

Domaine technique

L'invention se rapporte à l'inhibition du développement de microorganismes, par exemple des bactéries, dans un milieu, et en particulier un milieu liquide. Le liquide traité peut notamment être de l'eau usée, issue d'une installation domestique, industrielle ou hospitalière, ou tout autre liquide, y compris des liquides à usage agroalimentaire.

Description de l'art antérieur

Afin de limiter l'utilisation de produits chimiques, le recours à des méthodes physiques pour limiter le développement de microorganismes pathogènes, comme des bactéries, est étudié depuis plusieurs dizaines d'années. En effet, il s'avère que certains procédés ont un effet inhibiteur sur le développement de ces microorganismes. Parmi les méthodes investiguées, citons l'application d'ondes ultrasons, de lumière, d'un gradient de température ou d'un champ magnétique.

L'application de courants électriques faibles, continus ou à faible fréquence s'est également avérée efficace. Par exemple, dans la publication Costerton, «Mechanism of Electrical Enhancement of Efficacy of Antibiotics in Killing Biofilm Bacteria», Antimicrobial Agents and Chemotherapy, dec 1994, on a montré que l'application d'un courant continu à la surface d'une électrode métallique permettait d'éliminer un biofilm bactérien formé sur cette surface. Par ailleurs, cette publication met en évidence une efficacité remarquable lors de l'application combinée d'un courant électrique continu et d'un antibiotique. Cet effet de synergie est désigné par le terme « effet bioélectrique ».

Mais l'application de courants continus peut libérer des ions dans le milieu liquide, par électrolyse, ces derniers pouvant s'avérer toxiques à l'égard de cellules saines.

Récemment, la combinaison d'un champ électrique alternatif et d'un antibiotique, pour inhiber la croissance de bactéries, a été étudiée. Par exemple, la demande de brevet

US2012/0184895 décrit l'application d'un champ électrique alternatif d'amplitude faible (quelques V/cm) et d'un antibiotique sur des bactéries de type *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans ce document, des bactéries baignant dans un milieu de culture, sont placées entre deux électrodes entre lesquelles on applique une tension alternative dont la fréquence est successivement fixée à 0.1 MHz, 1 MHz, 5 MHz, 10 MHz, 20 MHz, 30 MHz et 50 MHz. A chaque fréquence, un essai d'une durée de plusieurs heures est réalisé, et l'évolution de la population bactérienne est contrôlée par des mesures de densité optique, à l'aide d'un spectrophotomètre, sur des échantillons prélevés.

Le document conclut que la fréquence de 10 MHz permet une inhibition maximale de la croissance bactérienne, et cela pour les deux bactéries étudiées. Cet effet est attribué à l'action de forces électrostatiques, en particulier des forces diélectrophorétiques agissant sur la membrane des cellules lors de la division cellulaire. Ces forces semblent notamment agir sur l'étranglement se formant entre les deux cellules filles, lors de la télophase, et induire une rupture de la membrane cellulaire. Lorsque la cellule en division est orientée parallèlement aux lignes de champ, l'intensité des forces est maximale. Parallèlement, des modélisations de ces forces ont été réalisées, mettant en évidence une intensité maximale à une fréquence de 2 MHz pour *Pseudomonas aeruginosa* , et à une fréquence de 7 MHz pour *Staphylococcus aureus*.

Par ailleurs, cette demande de brevet signale une diminution de la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique, en l'occurrence le chloramphenicol, placé dans le milieu de culture, en présence d'un champ électrique de fréquence égale à 10 MHz.

Il ressort de ce document que l'application d'un champ électrique alternatif a des effets indéniables sur la limitation de la prolifération bactérienne, mais qu'il existe une fréquence optimale pour chaque type de bactérie. Ainsi, chaque type de microorganisme semble avoir sa propre « sensibilité fréquentielle », qu'il est nécessaire de déterminer par des essais similaires à ceux décrits ci-dessus. En effet, rien ne dit qu'une fréquence optimale pour un microorganisme sera optimale pour un autre microorganisme. De plus, il n'est pas établi qu'une fréquence optimale à l'égard d'un

microorganisme dans un milieu donné sera également optimale, à l'égard du même microorganisme, dans un autre milieu.

Par ailleurs, dans les installations industrielles, on peut rencontrer différents types de microorganismes, et les techniques de purification doivent viser l'ensemble des microorganismes susceptibles d'être rencontrés. La méthode préconisée dans le document décrit ci-dessus, si elle semble efficace pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus,* ne le sera pas forcément pour d'autres espèces.

On recherche donc un procédé de traitement d'un milieu, en particulier un milieu liquide, visant à limiter la croissance bactérienne, voire à réduire la concentration en microorganismes, sans nécessiter leur identification préalable, et en limitant le recours à des agents chimiques. On recherche également un procédé efficace à l'égard d'une grande variété de microorganismes, et cela indépendamment du milieu dans lequel ils baignent.

Objet de l'invention

Un objet de l'invention est un procédé de traitement d'un milieu, notamment un milieu liquide, comprenant des microorganismes, le milieu étant disposé entre une première électrode et une deuxième électrode, à l'intérieur d'une enceinte,

- chaque électrode s'étendant dans ladite enceinte, au contact dudit milieu,
- chaque électrode étant reliée à un circuit électrique apte à établir une tension de polarisation, selon au moins une fréquence, entre lesdites électrodes,

le procédé étant caractérisé en ce que :

- ladite fréquence varie, dans un intervalle temporel inférieur à 1 heure, entre une fréquence minimale et une fréquence maximale, la fréquence maximale étant au moins deux fois supérieure à la fréquence minimale,

de façon à inhiber le développement desdits microorganismes dans le milieu.

Autrement dit, la tension de polarisation appliquée aux électrodes comprend, dans un intervalle temporel inférieur à 1 heure, une pluralité de composantes fréquentielles, s'étendant entre une fréquence minimale et une fréquence maximale.

La fréquence maximale peut être au moins 2 fois, ou 10 fois, ou 100 fois ou 1000 fois supérieure à la fréquence minimale.

Ledit intervalle temporel peut notamment être inférieur à 30 minutes, ou 20 minutes, ou 10 minutes, voire 1 minute ou encore 5 secondes voire 1 seconde.

De préférence, ladite tension de polarisation comporte simultanément une pluralité de composantes fréquentielles, entre ladite fréquence minimale et ladite fréquence maximale. Elle peut en particulier être produite par un générateur de bruit blanc.

Ladite fréquence minimale est de préférence supérieure à 10 Hz.

Ladite tension de polarisation génère, entre la première et la deuxième électrode, un champ électrique dont l'amplitude maximale est inférieure à 10 V/cm.

Lesdites première et deuxième électrodes sont de préférence métalliques, et comportent un métal, en particulier choisi parmi l'acier inoxydable, le platine ou l'or. Elles peuvent s'étendre l'une parallèlement à l'autre.

Le milieu peut notamment comporter un principe actif apte à inhiber la croissance des microorganismes, de préférence obtenu à partir de substances végétales naturelles.

Ce milieu peut notamment comprendre de l'eugenol, et éventuellement de l'acétate d'eugenol.

Un autre objet de l'invention est un dispositif pour la mise en œuvre du procédé tel que précédemment décrit, comportant :

- une enceinte, apte à recevoir un milieu comprenant des microorganismes,
- une première électrode et une deuxième électrode, chaque électrode étant reliée à un circuit électrique,

le dispositif étant caractérisé en ce que,

- le circuit électrique comporte un générateur apte à produire, aux bornes desdites électrodes, une tension de polarisation dont la fréquence varie, dans un intervalle temporel inférieur à 1 heure, entre une fréquence minimale et une fréquence maximale, la fréquence maximale étant au moins 2 fois supérieure à la fréquence minimale.

Les électrodes peuvent notamment être réalisées en acier inoxydable.

Le générateur peut comporter une source de courant ou de tension apte à générer, aux bornes des dites électrodes, une tension prenant la forme d'un bruit blanc.

Description des figures

La figure 1 représente un premier exemple de dispositif pour mettre en œuvre un procédé d'élimination de bactéries dans un milieu liquide.

Les figures 2 et 3 présentent des variantes de cet exemple, avec des électrodes de différentes géométries.

La figure 4 représente des résultats expérimentaux montrant l'évolution de la concentration bactérienne en fonction du temps pour différents essais réalisés.

La figure 5 représente des résultats expérimentaux montrant l'inhibition de la synthèse d'ATP (Adénosine Triphosphate) en fonction du temps, pour différents essais réalisés.

Description détaillée

La figure 1 décrit un premier exemple de dispositif apte à mettre en œuvre le procédé objet de l'invention.

Une enceinte 11 comprend un milieu 10, par exemple un liquide, et des microorganismes 12 baignant dans ce liquide. Le milieu 10 peut également être une gélose.

Dans cet exemple, les microorganismes 12 sont des bactéries de type *Escherichia coli*. Le milieu 10 est un milieu de culture liquide dit LB (acronyme de Luria-Bertani).

Deux électrodes 21 et 22 sont plongées dans le milieu liquide 10. Dans ce premier exemple, elles ont une forme parallélépipédique de longueur 8 cm, de hauteur 3 cm et d'épaisseur 0.5 mm. Les électrodes sont espacées d'une distance inter-électrode D de 1 cm. Les électrodes sont, dans cet exemple, en acier inoxydable. D'autres électrodes métalliques pourraient être utilisables, par exemple en platine ou en or. L'acier inoxydable apparaît comme un bon compromis coût / performances. De plus, l'acier inoxydable ne libère pas d'ions toxiques. Les électrodes s'étendent parallèlement l'une par rapport à l'autre.

Une alimentation électrique 23 produit un courant alternatif, de façon à générer, entre les bornes des électrodes 21, 22, une différence de potentiel, ou tension de polarisation U, alternative. Le milieu situé entre les électrodes est alors soumis à un champ électrique alternatif $\vec{E}$.

Afin d'éviter des échauffements ou la production d'ions toxiques dans le liquide par électrolyse, la fréquence de la tension de polarisation est supérieure à 10 Hz, et préférablement supérieure à 100 Hz voire 1 kHz.

L'alimentation électrique, ou générateur, 23 est ici une source de bruit blanc, c'est-à-dire une source produisant un signal de valeur moyenne nulle, et dont la densité spectrale de puissance est constante sur une bande de fréquence donnée. La largeur de la bande de fréquence, selon laquelle la densité spectrale de puissance est constante peut s'étendre sur une à 3 décades, voire davantage. Typiquement, cette bande de fréquence s'étend entre 10 kHz et 10 MHz.

Par constant, on entend ne s'écartant pas d'une même valeur à des fluctuations près, ces fluctuations pouvant atteindre 10 à 20 % de ladite valeur.

Le fait d'utiliser un tel générateur permet d'adresser une plage fréquentielle étendue, tout en étant de conception simple. De ce fait, et c'est un élément important de l'invention, le champ électrique $\vec{E}$ établi entre les électrodes 21 et 22 présente une multitude de composantes spectrales. Les inventeurs ont estimé que les microorganismes présents dans le milieu liquide sont susceptibles d'être sensibles à au

moins une de ces composantes spectrales, l'effet du champ électrique $\vec{E}$, à cette composante spectrale, étant alors apte à inhiber leur développement.

Dans les procédés de l'art antérieur, on sélectionne une fréquence parmi une plage fréquentielle étendue, à l'issue d'une phase d'apprentissage, au cours de laquelle un microorganisme particulier est soumis, successivement, à différentes fréquences, l'exposition à chaque fréquence ayant une durée de quelques heures. Cela permet de déterminer la fréquence à laquelle la bactérie que l'on souhaite éliminer est la plus sensible. On peut parler d'un optimum fréquentiel. Cet optimum étant sélectionné, on applique alors un champ électrique à cette fréquence optimale pour inhiber la croissance bactérienne.

Le procédé objet de l'invention résulte d'une approche différente, puisqu'il comprend l'application d'un signal comportant simultanément, ou dans un intervalle de temps rapproché, une pluralité de composantes spectrales, dans une bande spectrale étendue, de préférence supérieure à 1 décade, et typiquement entre 2 et 5 décades, et de préférence entre 3 et 4 décades. On cible alors la majeure partie des microorganismes présents dans l'échantillon, sans qu'il soit besoin de les identifier préalablement, et d'établir la fréquence optimale à l'égard sur chacun d'entre eux.

Par ailleurs, un optimum fréquentiel pour une bactérie peut dépendre du milieu dans lequel cette dernière est placée. En modifiant le milieu, l'optimum fréquentiel peut alors varier. Puisqu'il adresse une plage fréquentielle large, s'étendant de préférence selon plusieurs décades, le procédé objet de l'invention est plus robuste à l'égard de telles variations.

Le générateur de bruit blanc 23 peut aisément être fabriqué en mettant en œuvre, par exemple, une diode Zener polarisée en inverse, au voisinage d'une tension d'avalanche. Le signal produit par la diode Zener peut alors être amplifié par un amplificateur bas bruit, ou plusieurs amplificateurs disposés en série, avant d'être appliqué aux électrodes 21 et 22.

Mais même si cela constitue le mode de réalisation préféré, notamment parce qu'un générateur de bruit blanc est simple à réaliser, il n'est pas nécessaire que le signal appliqué aux électrodes soit un bruit blanc.

Ainsi, selon une variante, le générateur 23 est un générateur apte à produire, dans un intervalle temporel suffisamment court, et de préférence simultanément, un courant électrique ayant de multiples composantes fréquentielles, s'étendant sur au moins une voire deux décades, et de préférence sur au moins trois décades.

D'une façon générale, la fréquence du signal produit par le générateur 23 varie, dans un intervalle temporel inférieur à 1 heure, entre une fréquence minimale (f_{min}) et une fréquence maximale (f_{max}), la fréquence maximale f_{max} étant au moins 2 fois, voire 10 fois, voire au moins 100 fois supérieure à la fréquence minimale f_{min}.

En considérant que le temps de division cellulaire est compris entre 15 minutes et 30 minutes, un intervalle temporel d'1 heure correspond à une durée supérieure à deux fois le temps de division cellulaire. Le procédé est d'autant plus efficace que l'intervalle temporel, durant lequel les multiples fréquences sont appliquées, est faible.

Ainsi, l'intervalle temporel peut être réduit à 30 minutes, ou 20 minutes, ou 10 minutes, ou 1 minute, ou être inférieur à 5 secondes ou même 1 seconde.

La figure 2 représente un autre mode de réalisation, dans lequel les électrodes 21 et 22 sont placées selon une configuration coaxiale : la première électrode 21 est en forme de barreau, de diamètre inférieur à 1 cm, par exemple 0,5 mm, tandis que la deuxième électrode 22 a une forme annulaire, coaxiale de la première électrode.

La figure 3 représente un autre mode de réalisation, dans lequel les électrodes 21 et 22 sont en forme de « peigne », ou « interdigitées ». Chaque électrode présente un tronçon latéral 21A, 22A duquel une pluralité de bras 21B, 22B font saillie, chaque bras s'étendant de préférence l'un parallèlement à l'autre. De préférence, chaque bras s'étend perpendiculairement au tronçon latéral auquel il est relié. Les électrodes 21 et 22 sont disposées face à face, de telle sorte qu'un bras d'une électrode s'étend entre deux bras adjacents de l'autre électrode. Ce mode de réalisation est adapté au traitement de volumes plus importants.

Quel que soit le mode de réalisation, la distance D entre les deux électrodes 21 et 22 est de préférence centimétrique, en étant compris entre 0.5 cm et 15 voire 20 cm. Au-delà, la tension de polarisation doit augmenter, sachant que le champ électrique E entre deux électrodes a de préférence une amplitude de quelques V/cm, de préférence comprise entre 1 et 10 V/cm.

Essais

Des essais expérimentaux ont été réalisés, en utilisant une configuration telle que représentée sur la figure 1, la tension de polarisation appliquée ayant un spectre fréquentiel de bruit blanc entre 10 kHz et 10 MHz, et une amplitude de 5 V. Les électrodes étant espacées de 1 cm, l'amplitude maximale du champ électrique $\overrightarrow{E}$ entre les deux électrodes s'élève à 5 V/cm.

Dans certaines configurations, un produit biocide a été ajouté dans le milieu de culture. Il s'agit du biocide dont la référence est Bioscreen BS 33, fourni par la société Hightech Bio Activities Holding GMBH. Sa composition est décrite dans le brevet FR2867947. Il comprend essentiellement de l'eugenol, et, dans une moindre mesure de l'acétate d'eugenol, ces composants étant notamment obtenus à partir de clou de girofle. L'utilisation d'un tel biocide, obtenu à l'aide de substances végétales naturelles, limite les effets néfastes sur l'environnement.

Trois configurations sont étudiées :

- configuration 1 : aucun traitement : l'échantillon comporte le milieu de culture tel que précédemment décrit ; Il s'agit de la configuration témoin ;
- configuration 2 : application de la tension alternative telle que précédemment décrite à l'échantillon ;
- configuration 3 : ajout du biocide précédemment décrit, dilué au 1/8^{ième}, et application de la tension alternative, de façon analogue à la configuration 2.

La concentration initiale en bactéries *Escherichia coli* s'élève à 5 10^8 bactéries par ml. La température de chaque échantillon a été maintenue à 20°C durant les essais.

La figure 4 représente l'évolution de la concentration bactérienne dans le milieu, dans les configurations 2 et 3, en fonction du temps les points de mesure étant réalisés à t_0, t_0 + 30 min, t_0 + 60 min, t_0 + 120 min, t_0 + 240 min et t_0 + 360 min, t_0 représentant le début de l'expérience, et correspondant à l'abscisse 0 sur la figure 4. Les abscisses sont exprimées en minutes tandis que chaque ordonnée représente la concentration bactérienne normalisée par la concentration dans l'échantillon témoin (configuration 1), au même instant. Chaque ordonnée représente, sous forme de pourcentage, l'évolution de la population bactérienne relativement à l'échantillon témoin de la configuration 1. Les marges d'erreur ne sont pas représentées.

La quantification de la population bactérienne a été réalisée par prélèvement à différents instants, puis dilution et étalement du prélèvement sur gélose, avant comptage visuel des colonies formées 24h à 48 h après l'étalement.

La configuration n° 2 (application d'un champ électrique seul) conduit à une réduction de la concentration bactérienne, d'environ 25% en 6 heures, par rapport à l'échantillon témoin.

La configuration n° 3 (combinaison biocide et champ électrique) conduit à une réduction de la concentration bactérienne d'environ 40% en 6 heures, par rapport à l'échantillon témoin.

Cet essai montre que l'application d'un champ électrique alternatif, présentant simultanément des composantes spectrales comprises entre 10 kHz et 10 MHz, permet de réduire la croissance bactérienne dans un échantillon au bout de quelques heures. Un autre point remarquable est que l'effet du biocide sur la prolifération bactérienne améliore significativement l'effet du champ électrique. Cela confirme l'effet de synergie entre le biocide et l'application d'un champ électrique, effet désigné dans l'art antérieur par « effet bioélectrique ».

Parallèlement au dénombrement des bactéries par méthode visuelle, des mesures par ATPmétrie (dosage de l'Adénosine Triphospate par luminescence) ont été réalisées, sur chaque échantillon, à t_0, t_0 + 120 min, t_0 + 240 min et t_0 + 360 min, t_0 représentant le début de l'expérience, et correspondant à l'abscisse 0 sur la figure 5. Après prélèvement,

lyse et récupération du culot, des mesures par bioluminescence ont été réalisées, représentatives de la concentration en ATP dans l'échantillon. Ces mesures sont représentatives de l'énergie libérée par le métabolisme des bactéries contenues dans l'échantillon.

La figure 5 représente les résultats de ces mesures, pour les trois configurations étudiées. L'axe des abscisses représente le temps écoulé depuis le début de l'expérience, l'axe des ordonnées représentant, en échelle arbitraire, l'intensité mesurée du signal de luminescence.

Sur l'échantillon témoin (configuration 1), on observe un accroissement de la concentration d'ATP, indiquant une croissance bactérienne soutenue.

Les configurations 2 et 3 se distinguent par un accroissement nettement moins marqué de la concentration d'ATP, ce qui témoigne de l'effet du champ électrique seul ou, mieux, en combinaison avec un biocide, pour l'inhibition de la croissance bactérienne.

Par ailleurs, les échantillons ont fait l'objet d'un contrôle de la température par observation à l'aide d'une caméra thermique. Aucun échauffement significatif n'a été observé.

Enfin, un dosage d'ions, a été réalisé sur prélèvements, par ICP-OES (acronyme de Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry, signifiant couplage plasma induit par haute fréquence – spectrométrie optique). Ce dosage n'a pas révélé d'augmentation significative de la concentration en ions métalliques dans le milieu.

Le procédé décrit pourra s'appliquer à tout liquide dont on souhaite maîtriser ou réduire la prolifération bactérienne, en laboratoire ou à l'échelle industrielle, par exemple dans le domaine agroalimentaire, le traitement de l'eau, par exemple l'eau domestique ou l'eau de piscines, ou le traitement d'autres effluents liquides.

A l'échelle millimétrique ou microscopique, il pourra être intégré dans des cartes microfluidiques aptes à la mise en œuvre d'analyses ou de procédés sur des échantillons biologiques. Les électrodes peuvent être intégrées à la carte lors de la fabrication de

cette dernière, en mettant en œuvre des techniques de microfabrication usuelles permettant le dépôt d'un métal.

Le procédé peut être en particulier mis en œuvre en amont de processus biologiques, de traitement ou d'analyse, afin d'éliminer ou de réduire la quantité de bactéries dans l'échantillon traité.

Revendications

1. Procédé de traitement d'un milieu (10) comprenant des microorganismes (12), le milieu étant disposé entre une première électrode (21) et une deuxième électrode (22), à l'intérieur d'une enceinte (11),

- chaque électrode s'étendant dans ladite enceinte, au contact dudit milieu (10),
- chaque électrode étant reliée à un circuit électrique (20) apte à établir une tension de polarisation (U), selon au moins une fréquence (f), entre lesdites électrodes,

le procédé étant caractérisé en ce que :

- ladite fréquence (f) varie, dans un intervalle temporel inférieur à 1 heure, entre une fréquence minimale (f_{min}) et une fréquence maximale (f_{max}), la fréquence maximale (f_{max}) étant au moins 2 fois supérieure à la fréquence minimale (f_{min}),

de façon à inhiber le développement desdits microorganismes dans le milieu.

2. Procédé de traitement selon la revendication 1, dans lequel ledit intervalle temporel est inférieur à 30 minutes ou 10 minutes ou 1 minute ou 5 secondes ou 1 seconde.

3. Procédé de traitement selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite tension de polarisation (U) comporte simultanément une pluralité de composantes fréquentielles, entre ladite fréquence minimale (f_{min}) et ladite fréquence maximale (f_{max}).

4. Procédé de traitement selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la dite tension de polarisation (U) est produite par un générateur de bruit blanc (23).

5. Procédé de traitement selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la fréquence maximale (f_{max}) est au moins dix fois ou cent fois ou mille fois supérieure à la fréquence minimale (f_{min}).

6. Procédé de traitement selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la fréquence minimale (f_{min}) est supérieure à 10 Hz.

7. Procédé de traitement selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite tension de polarisation (U) génère, entre la première et la deuxième électrode, un champ électrique ($\vec{E}$) dont l'amplitude maximale est inférieure à 10 V/cm.

8. Procédé de traitement selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel lesdites première et deuxième électrodes sont métalliques, et comportent un métal choisi parmi l'acier inoxydable, le platine ou l'or.

9. Procédé de traitement selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le milieu comporte également un principe actif apte à inhiber la croissance des microorganismes.

10. Procédé de traitement selon la revendication 9, dans lequel le principe actif est obtenu à partir de substances naturelles végétales.

11. Dispositif pour la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications précédentes, comportant :

- une enceinte, apte à recevoir un milieu (10) comprenant des microorganismes,
- une première électrode (21) et une deuxième électrode (22), chaque électrode étant reliée à un circuit électrique (20),

le dispositif étant caractérisé en ce que,

- le circuit électrique (20) comporte un générateur (23) apte à produire, aux bornes desdites électrodes (21, 22), une tension de polarisation dont la fréquence (f) varie, dans un intervalle temporel inférieur à 1 heure, entre une fréquence minimale (f_{min}) et une fréquence maximale (f_{max}), la fréquence maximale (f_{max}) étant au moins 2 fois supérieure à la fréquence minimale (f_{min}).

12. Dispositif selon la revendication 11, dans lequel ledit intervalle temporel est inférieur à 20 minutes ou à 10 minutes ou à 1 minute.

13. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12, dans lequel le générateur (23) comprend une source de courant ou de tension apte à générer, aux bornes des dites électrodes, une tension prenant la forme d'un bruit blanc.

14. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que les électrodes (21 ,22) sont réalisées en acier inoxydable.

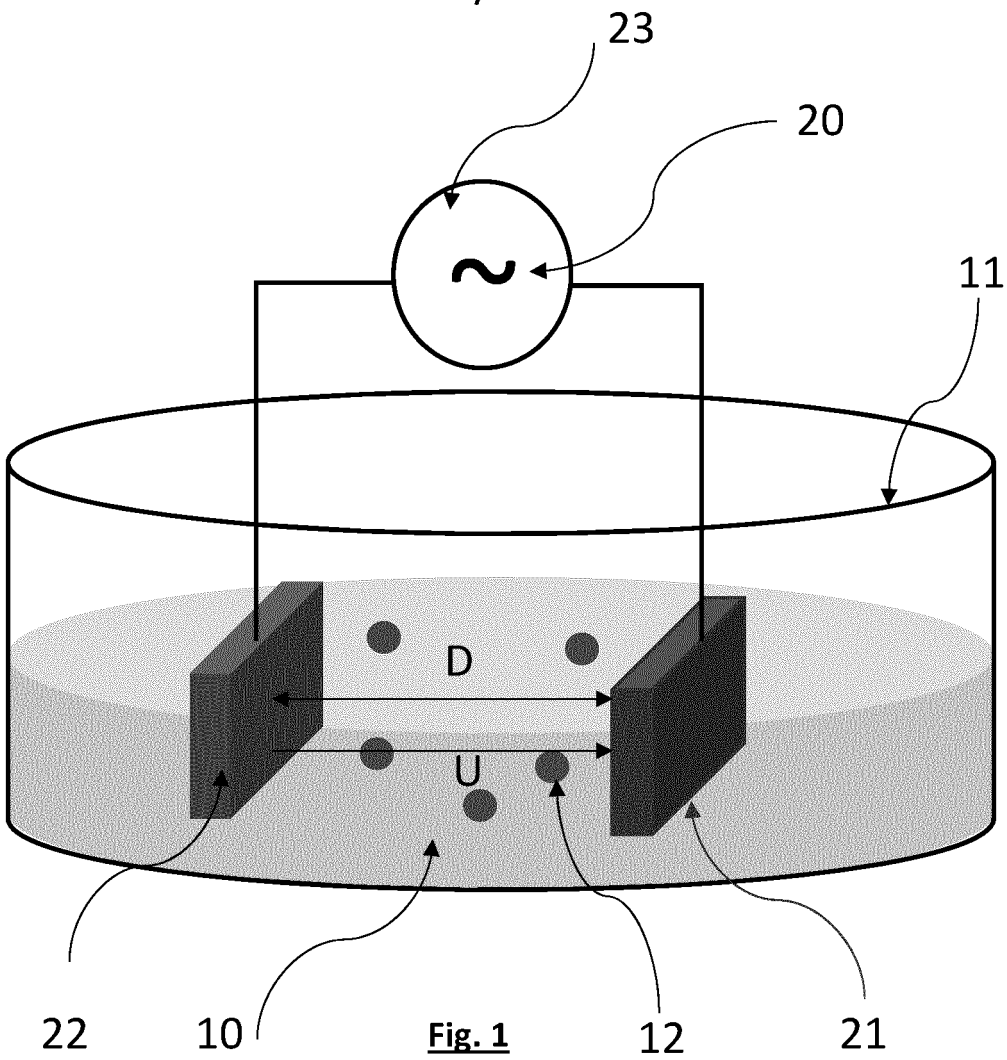


Fig. 1

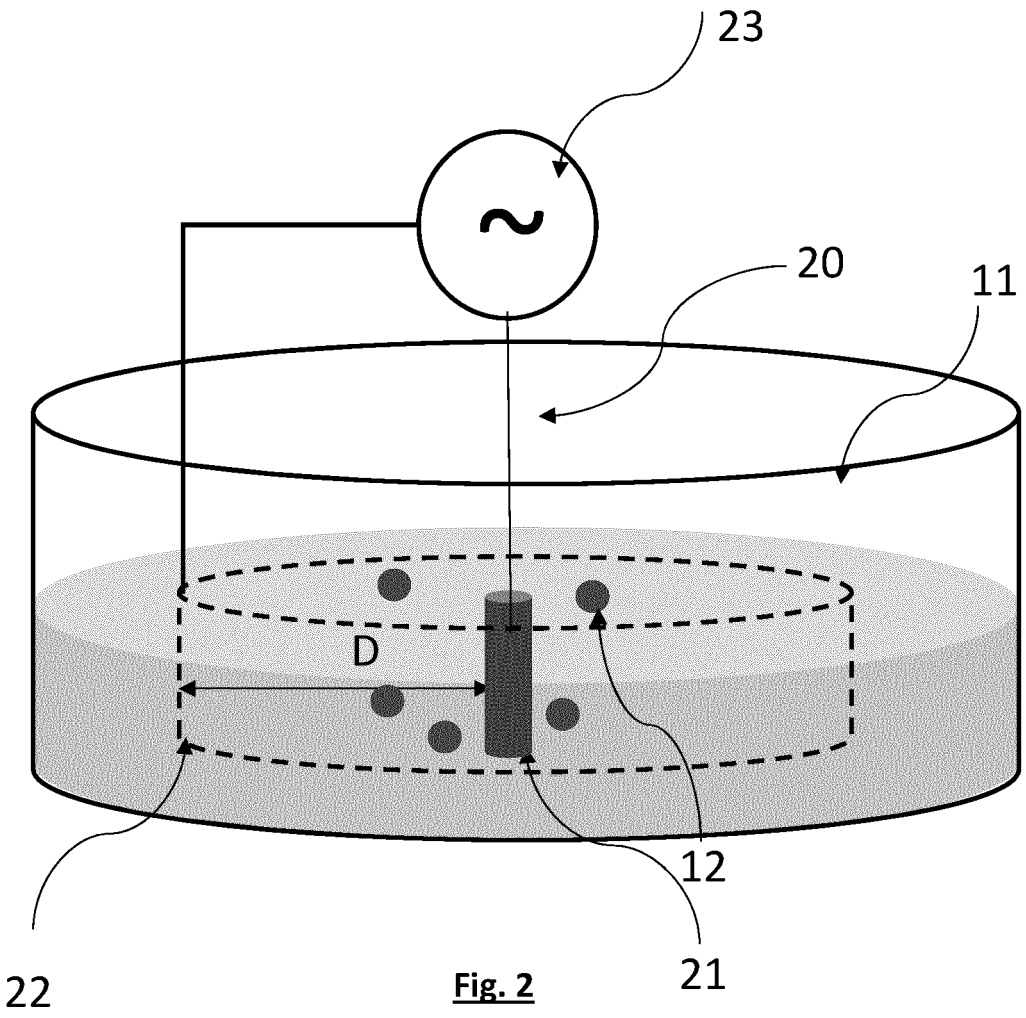


Fig. 2

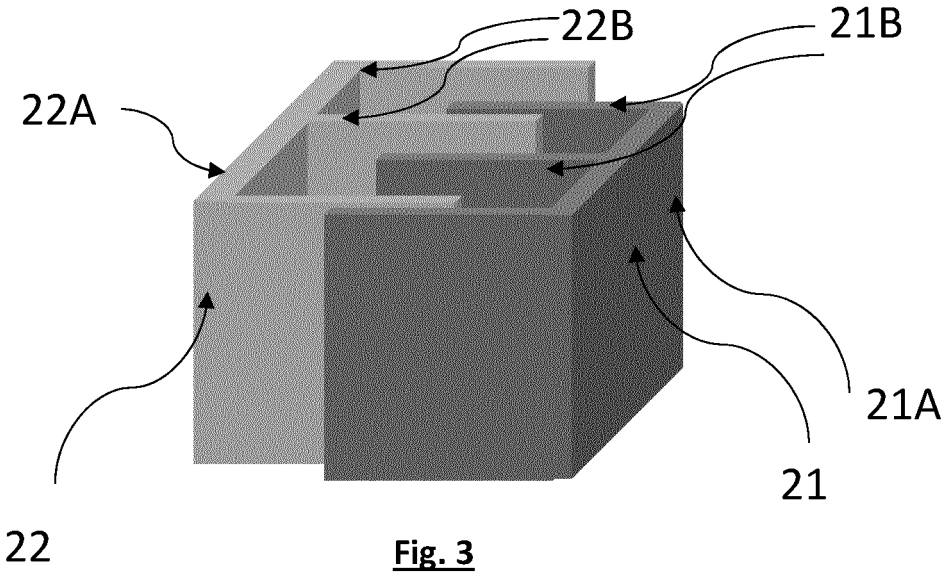


Fig. 3

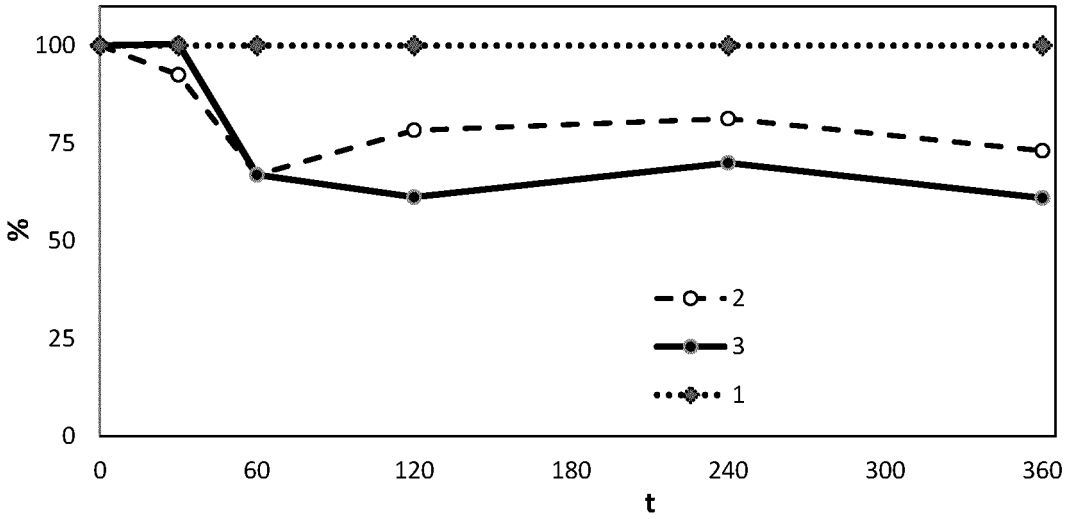

100
75
%
50
25
0
0
60
120
180
240
300
360
t
2
3
1

Fig. 4

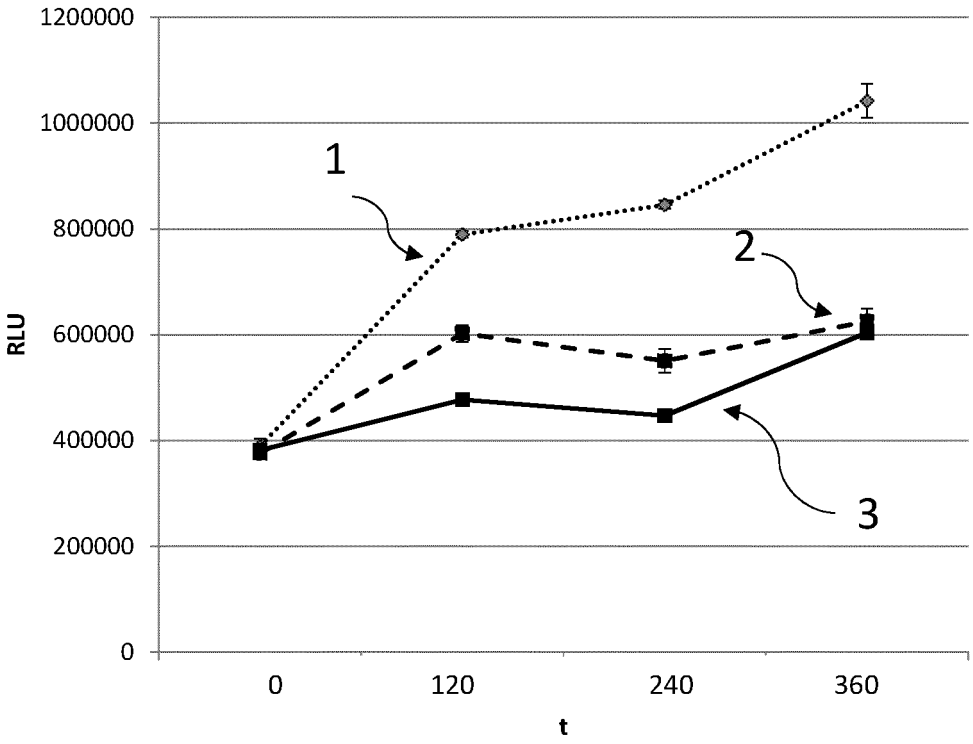

1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
RLU
0
120
240
360
t
1
2
3

Fig. 5

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 811925
FR 1554922

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	WO 2011/132021 A1 (PERISO SA [CH]; TONEATTO DOMENICO [CH]; VOLO CATALDO [IT]; MALCOTTI GI) 27 octobre 2011 (2011-10-27) * p. 4 li. 31-p. 5 li. 2, p. 5 li. 20-28, p. 5 li. 33-p. 6 li. 4, p. 3 li. 1-26, p. 4 li. 1-11, p. 7 li. 2-18, p. 8 li. 9-21, p. 9 li. 2-14, p. 10 li. 24-29, p. 6 li. 3-4; revendication 12; figures 1-5 *	1-14	C12N13/00 C02F1/48
A	EP 0 952 117 A2 (HAYAKAWA HIDEO [JP]) 27 octobre 1999 (1999-10-27) * le document en entier *	1-14	
A	WO 2007/015684 A1 (ECOSPEC GLOBAL TECHNOLOGY PTE [SG]; CHEW HWEE HONG [SG]) 8 février 2007 (2007-02-08) * le document en entier *	1-14	
A	WO 2004/103912 A1 (WATERTECH SERVICES INTERNAT PT [AU]; JONES PHILIP HENRY [AU]; STUTT GA) 2 décembre 2004 (2004-12-02) * le document en entier *	1-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C02F F24H F24D

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
21 octobre 2015	Landré, Julien

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

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1554922 FA 811925

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 21-10-2015
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2011132021 A1	27-10-2011	EP 2560921 A1	27-02-2013
		WO 2011132021 A1	27-10-2011
EP 0952117 A2	27-10-1999	CN 1233590 A	03-11-1999
		DE 69920316 D1	28-10-2004
		DE 69920316 T2	06-10-2005
		EP 0952117 A2	27-10-1999
		JP 3337422 B2	21-10-2002
		JP H11300358 A	02-11-1999
		KR 100370551 B1	29-01-2003
		US 6139717 A	31-10-2000
WO 2007015684 A1	08-02-2007	EP 1917216 A1	07-05-2008
		SG 129314 A1	26-02-2007
		US 2007029261 A1	08-02-2007
		WO 2007015684 A1	08-02-2007
WO 2004103912 A1	02-12-2004	CN 1826293 A	30-08-2006
		EP 1633681 A1	15-03-2006
		ES 2423230 T3	18-09-2013
		NZ 544334 A	28-09-2007
		US 2006054568 A1	16-03-2006
		WO 2004103912 A1	02-12-2004

EPO FORM P0465