

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

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

3 044 415

②1 N° d'enregistrement national : **15 61446**

⑤1 Int Cl⁸ : **G 01 N 21/65 (2017.01), C 12 Q 1/02**

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 27.11.15.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 02.06.17 Bulletin 17/22.

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) : BIOMERIEUX — FR et COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES — FR.

⑦2 Inventeur(s) : NOVELLI-ROUSSEAU ARMELLE, ESPAGNON ISABELLE, JOSSO QUENTIN, DOUET ALICE, MALLARD FREDERIC et GAL OLIVIER.

⑦3 Titulaire(s) : BIOMERIEUX, COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES.

⑦4 Mandataire(s) : CABINET GERMAIN & MAUREAU.

⑤4 **PROCEDE DE DETERMINATION DE LA REACTION D'UN MICROORGANISME A SON EXPOSITION A UN ANTIBIOTIQUE.**

⑤7 L'invention concerne un procédé de détermination de la réaction d'au moins une bactérie d'intérêt à son exposition à un antibiotique mettant en oeuvre une analyse par spectroscopie Raman et comprenant les étapes suivantes:

On dispose d'un échantillon biologique susceptible de contenir lesdites bactéries d'intérêt,

On prépare au moins deux fractions dudit échantillon comprenant chacune une ou plusieurs bactéries d'intérêt vivantes,

On capture dans chaque fraction au moins une bactérie d'intérêt vivante à l'aide d'un partenaire de liaison,

On expose au moins l'une des fractions à au moins une concentration d'au moins un antibiotique donné, l'autre des fractions étant la fraction de contrôle,

On soumet la ou les bactérie(s) d'intérêt contenue(s) dans les fractions à une lumière incidente et on analyse la lumière résultante obtenue par diffusion Raman par la ou les bactérie(s) d'intérêt par spectroscopie Raman pour obtenir autant de spectres Raman que de bactéries,

On traite lesdits spectres pour obtenir une signature de la réaction de la ou de chacune des bactérie(s) d'intérêt à l'exposition dudit antibiotique et du contrôle,

On compare la signature ainsi obtenue par bactérie d'in-

térêt, à une base de référence définie dans les mêmes conditions que ci-dessus, pour différentes bactéries et au moins ledit antibiotique, et

On définit un profil clinique de sensibilité de ladite bactérie d'intérêt audit antibiotique.

FR 3 044 415 - A1



L'invention relève du champ de l'analyse du phénotype de sensibilité des microorganismes aux antibiotiques. Elle concerne la détermination de la réaction d'au moins un microorganisme d'intérêt à son exposition à un antibiotique mettant en œuvre une analyse par spectroscopie Raman et ses applications.

Le terme « microorganisme » couvre tout microorganisme susceptible de réagir à son exposition à un antibiotique, tel que les bactéries ou les levures. Bien que l'invention soit plus spécifiquement décrite ci-après en référence aux bactéries, il est entendu qu'elle ne s'y limite pas.

Cette détermination est d'intérêt majeur dans le diagnostic microbiologique dans les domaines de la santé, de l'agroalimentaire, de l'environnement, elle peut s'avérer tout aussi importante en pharmacologie, dans le criblage de nouvelles molécules, notamment antibiotiques, ou à la recherche de composés cytotoxiques présents dans des produits alimentaires, comme par exemple le lait. Cette sélection d'applications n'est pas exhaustive, et de manière générale, l'invention peut trouver une application dans tout domaine dès lors que la question est posée de la réaction de cellules à une exposition à un composé chimique ou biologique.

L'effet Raman est un phénomène de diffusion de la lumière qui s'applique à la très grande majorité des molécules. Son observation en spectroscopie permet de caractériser une molécule, un microorganisme, un milieu, elle est d'une mise en œuvre simple, elle est rapide et économique, et présente l'avantage substantiel en biologie de ne pas être fortement perturbée par l'eau et de ne pas nécessiter de marquage ou d'agent de contraste.

Ainsi selon le document AIM Athamneh et al. (2014) Antimicrob Agents Chemother 58:1302-1314, les auteurs ont utilisé la spectroscopie Raman afin de caractériser la sensibilité de cultures de *E. coli* à 15 antibiotiques connus représentant 5 familles d'antibiotiques, afin de constituer une base de référence. A cet effet, le procédé décrit comprend les étapes suivantes, réalisation d'une culture de *E. coli*, exposition d'un échantillon de cette culture à des antibiotiques en une concentration du triple de la concentration minimale inhibitrice (CMI), maintien desdites cellules en contact avec l'antibiotique pendant au moins 30 minutes, récolte et lavage des cellules bactériennes, prélèvement d'une suspension cellulaire et traitement pour analyse des couches de cellules par spectroscopie Raman. Le résultat de l'analyse est tiré de la moyenne d'une multiplicité de spectres obtenus pour chaque prélèvement comprenant une multitude de cellules et intégré dans la base de référence. Une fois constituée, cette base de référence peut être exploitée pour affecter un antibiotique

inconnu à une desdites 5 familles, selon la sensibilité d'une culture de *E. coli* à cet antibiotique. Les performances de classification ainsi obtenues permettent d'obtenir des éléments quant à la classe de la molécule inconnue ce qui peut être utile pour la recherche pharmacologique. Les résultats obtenus ne fournissent toutefois pas
5 d'information liée au phénotype de sensibilité des bactéries étudiées ni d'information propice à une utilisation clinique.

Le document WO2013/093913A1 décrit un procédé d'identification d'une bactérie dans un liquide biologique utilisant notamment la spectroscopie Raman. Un échantillon d'une culture bactérienne dudit liquide biologique est soumis à une
10 lumière incidente et la lumière résultante obtenue par diffusion est analysée par spectroscopie Raman. Le signal lu est alors interprété grâce à une base de référence répertoriant la signature spectrale propre de différents microorganismes définie dans les mêmes conditions. Ce procédé peut en outre comprendre une étape d'exposition des dites bactéries à un antibiotique, le signal alors lu étant un effet dudit antibiotique
15 sur ces bactéries. L'effet de l'antibiotique mesuré s'exerce notamment sur la viabilité des cellules bactériennes ou le développement de la culture. L'inconvénient de ce procédé réside dans son recours à une étape de culture qui, non seulement rallonge l'obtention d'une réponse, mais qui, de plus, nécessite de maîtriser une étape supplémentaire indispensable pour obtenir la réponse attendue.

Si l'utilisation de la spectroscopie Raman permet d'alléger la détermination du profil clinique de sensibilité à un antibiotique de bactéries d'intérêt, il n'en demeure pas moins que, selon cet art antérieur, elle est appliquée à une culture bactérienne dont l'obtention dans un temps de l'ordre 18 à 24 heures, ne permet pas d'accéder à un procédé de détermination rapide. En diagnostic, ceci constitue un frein important à
25 une prise en charge efficace des patients.

Selon le document U. Münchberg et al. (2014) Anal Bioanal Chem 406 :3041-3050, les auteurs posent le problème de la mise en place rapide d'un traitement antibiotique approprié chez un patient, ainsi que les difficultés rencontrées par des techniques ayant recours à une culture cellulaire lorsque le patient a déjà reçu un
30 traitement antibiotique. Les auteurs s'affranchissent alors de l'étape de culture et appliquent la spectroscopie Raman à des bactéries individuelles. Ces travaux abordent donc la question de la difficulté d'identification de bactéries ayant préalablement été exposées à un antibiotique, source potentielle d'un diagnostic erroné. Pour résoudre ce problème, les auteurs constituent une base de référence comprenant les résultats
35 de l'analyse Raman réalisée sur des cellules individuelles non exposées à un antibiotique et sur des cellules qui ont été exposées à un antibiotique, dans

différentes concentrations inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI). La conclusion de cette étude est une absence de difficulté majeure à identifier les bactéries dans ces conditions. Les auteurs n'ont pas remarqué d'effet significatifs des antibiotiques sur les spectres bactériens et concluent que les modifications éventuelles sont observées dans des zones de fortes variabilité et donc inexploitable.

5 Aucune de ces solutions ne permet d'envisager un procédé fiable de détermination du profil clinique de sensibilité à un antibiotique d'une bactérie d'intérêt et en particulier de sa résistance ou sa sensibilité à un antibiotique, en un temps court de l'ordre de quelques heures qui permettrait d'avoir un diagnostic dans
10 la journée. Ce manque est responsable d'antibiothérapies inefficaces, de risques d'aggravation de l'infection du patient et d'une difficulté à rendre un diagnostic exact quand le patient a déjà été traité. Ce manque est d'autant plus ressenti à l'heure de l'émergence et la diffusion de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques.

L'invention apporte une réponse à ce besoin avec un procédé de
15 détermination de la réaction d'une souche bactérienne d'intérêt à son exposition à un antibiotique, ne nécessitant aucune culture, dont le résultat accessible en environ 2 heures est donc très rapide par rapport aux méthodes de l'état de l'art (36h-72h), et qui est en outre fiable.

L'invention concerne un procédé de détermination de la réaction d'au moins
20 un microorganisme d'intérêt, tel qu'une bactérie d'intérêt, à son exposition à un antibiotique mettant en œuvre une analyse par spectroscopie Raman et comprenant les étapes suivantes :

On dispose d'un échantillon biologique susceptible de contenir lesdites bactéries d'intérêt,

25 On prépare au moins deux fractions dudit échantillon comprenant chacune une ou plusieurs bactéries d'intérêt vivantes,

On capture dans chaque fraction au moins une bactérie d'intérêt vivante à l'aide d'un partenaire de liaison,

30 On expose au moins l'une des fractions à au moins une concentration d'au moins un antibiotique donné, l'autre des fractions étant la fraction de contrôle,

On soumet la ou les bactérie(s) d'intérêt contenue(s) dans les fractions à une lumière incidente et on analyse la lumière résultante obtenue par diffusion Raman par la ou les bactérie(s) d'intérêt par spectroscopie Raman pour obtenir autant de spectres Raman que de bactéries,

35 On soumet le matériau constituant le support dans les fractions à une lumière incidente et on analyse la lumière résultante obtenue par diffusion Raman dudit

support par spectroscopie Raman pour obtenir quelques spectres Raman de ce support,

On traite lesdits spectres pour obtenir une signature de la réaction de la ou de chacune des bactérie(s) d'intérêt à l'exposition dudit antibiotique et du contrôle,

5 On compare la signature ainsi obtenue par bactérie d'intérêt, à une base de référence définie dans les mêmes conditions que ci-dessus, pour différentes bactéries et au moins ledit antibiotique, et

On définit un profil clinique de sensibilité de ladite bactérie d'intérêt audit antibiotique.

10 L'intérêt du procédé de l'invention par rapport à l'état de la technique précité, réside en ce qu'il permet d'obtenir un signal pertinent, corrélé aux modifications chimiques des microorganismes en réponse à leur exposition au composé testé à l'aide de la spectrométrie Raman, et ce pour des cellules individuelles. Non seulement il s'affranchit de l'étape de culture cellulaire, mais en outre, il fournit une information
15 par cellule analysée. Contrairement aux procédés connus, l'information n'est pas obtenue par le calcul d'une moyenne des résultats d'analyse ou par l'obtention d'une mesure moyennée physiquement. Elle est l'expression d'un résultat par cellule, ce qui conduit à une information plus pertinente en ce qu'elle permet de détecter une variabilité, et qui pourrait être sensiblement différente de celle issue d'une moyenne
20 de résultats qui masque toute hétérogénéité. Bien entendu, en fonction des applications considérées, l'information peut être obtenue à partir du résultat de plusieurs cellules individuelles.

Selon l'invention, on apporte un procédé de détermination de la réaction d'une bactérie à son exposition à un antibiotique, par spectroscopie Raman, qui est
25 adapté à toutes les applications envisagées ci-dessus. Il peut effectivement être destiné à la caractérisation du profil clinique de sensibilité d'une bactérie d'intérêt à un antibiotique, dans un échantillon biologique, mais il peut en outre être aménagé pour le criblage de molécules antibiotiques. Puisqu'il n'a pas recours à une étape de culture, il est aussi approprié à l'analyse des cellules non cultivables.

30 Avant d'aborder plus en détails, la description du procédé de l'invention, certains termes employés sont ci-après définis.

Par échantillon biologique, on entend un tissu, un fluide, ainsi que des composants desdits tissu et fluide. Selon le domaine d'application du procédé, et à titre d'exemples non exhaustifs, l'échantillon peut être d'origine humaine ou animale
35 tel que du sang, de l'urine, de la salive, du lait maternel ; il peut être d'origine végétale, être un extrait alimentaire, un extrait du sol...

Par réaction d'un microorganisme d'intérêt tel qu'une bactérie d'intérêt à son exposition à un antibiotique (ATB), on comprend toute modification, par exemple métabolique, qui peut être détectée par spectroscopie Raman par rapport à la même bactérie non exposée à un antibiotique.

5 La concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un antibiotique pour une bactérie donnée, exprimée en $\mu\text{g/ml}$, est la plus petite concentration dudit antibiotique d'une gamme de dilutions capables de stopper la croissance bactérienne.

Un breakpoint clinique est une concentration donnée d'un antibiotique définie pour une espèce, déterminé par l'EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) sur la base de critères microbiologiques et de données pharmacinétiques et pharmacodynamiques. Classiquement, deux breakpoints différents, dites valeurs seuil, sont définis et déterminent ainsi un intervalle de concentrations. Lorsque la CMI d'une souche testée est en-deçà de cet intervalle, la souche testée est qualifiée de sensible, c'est-à-dire qu'elle est susceptible d'être
10 inhibée *in vivo* impliquant donc une forte probabilité de succès thérapeutique ; si elle se trouve dans cet intervalle, la bactérie est dite intermédiaire, et si elle est au-delà de cet intervalle, la bactérie est dite résistante, c'est-à-dire qu'elle supporte des concentrations d'antibiotique supérieures à celles acceptables *in vivo* et pour laquelle il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique.

20 Par signature de la réaction d'un microorganisme d'intérêt à son exposition à un composé chimique, on entend toute variation par exemple métabolique ou constitutionnelle, exprimée par ledit microorganisme spécifiquement en réponse à son contact avec ledit composé et qui peut être détectée par spectrométrie Raman. Afin de mettre plus facilement en évidence ces variations, on peut également appeler
25 signature le résultat d'une ou plusieurs étapes de traitement des données Raman aboutissant à un signal utilisé pour réaliser le test. A titre d'exemple, on peut choisir de soustraire un état initial ou une condition où les bactéries d'intérêt n'ont pas été exposées au composé testé aux spectres acquis sur des bactéries exposées.

Des variantes préférentielles d'un procédé de l'invention sont ci-après
30 présentées, elles doivent être considérées seules ou en combinaison. Elles sont davantage appropriées à des applications diagnostiques, et précisément à la détermination du profil clinique de sensibilité d'une bactérie à un antibiotique dans un échantillon biologique, mais comme dit précédemment le procédé de l'invention n'est pas restreint à de telles applications.

35 La détermination du profil clinique de sensibilité d'une bactérie à un antibiotique consiste dans un premier temps à identifier le phénotype de sensibilité

d'une bactérie à un antibiotique. Ainsi, on prépare de préférence plus de deux fractions dudit échantillon et on expose au moins deux fractions à des concentrations croissantes, respectivement, de l'antibiotique. Selon des variantes du procédé de l'invention, on expose au moins trois fractions dudit échantillon, voire quatre ou cinq ou plus, à des concentrations croissantes, respectivement, de l'antibiotique.

Avantageusement, les concentrations dudit antibiotique sont choisies dans un intervalle de valeurs reflétant des concentrations classiques de tests *in vitro*, permettant ainsi une comparaison aux données de référence actuelles, par exemple à aux tests par microdilution. Selon une variante préférentielle, les concentrations de l'antibiotique auxquelles la ou les fractions sont respectivement exposées, sont comprises dans un intervalle de valeurs incluant au moins l'une des valeurs choisies parmi les CMI typiques et les valeurs seuils des breakpoints cliniques pour le couple espèce/antibiotique testé, ou des panels de concentrations utilisés dans les méthodes de référence. Dans une application diagnostique du procédé de l'invention, ces concentrations sont donc spécifiquement choisies en fonction du couple bactérie/antibiotique considéré A titre d'exemple pour le couple *E.coli*/Gentamicine pour lesquelles la CMI typique, ou le cut-off épidémiologique de l'espèce, est de 2 µg/mL et les deux breakpoints cliniques sont 2 et 4 µg/mL, elles peuvent être comprises dans un intervalle de valeurs incluant au moins l'une des valeurs choisies parmi 1, 2, 4 et 8 et 16 µg/ml, de préférence deux, voire trois ou quatre de ces valeurs ou même ces cinq valeurs.

Le procédé de l'invention comprend une étape de capture d'une bactérie d'intérêt au moyen d'un partenaire de liaison. Un partenaire de liaison selon l'invention reconnaît spécifiquement ou non spécifiquement une bactérie d'intérêt pour la capture de celle-ci en vue de son analyse. Lors de son interaction avec la bactérie, le partenaire de liaison peut être présent à l'état libre dans le milieu ou peut avoir été préalablement immobilisé sur un support. Si la fixation de la bactérie sur le partenaire de liaison a lieu dans le milieu, une immobilisation dudit partenaire sur le support peut être réalisée ensuite. Par immobilisation sur un support, on entend une immobilisation directe ou indirecte dudit partenaire de liaison sur ledit support, par tout moyen bien connu de l'homme du métier. Un partenaire de liaison selon l'invention peut être de nature biologique et/ou chimique. Ainsi, à titre d'exemple, dans le cas d'une capture non spécifique, ou générique, des cellules, il peut consister en un composé chimique ou porter des fonctions chimiques qui interagira (ont) avec les cellules. Des polymères de type chitosan, poly-L-lysine, polyéthylèneimine et polyaniline en sont des illustrations. Il peut consister en une molécule biologique telle que choisie parmi les protéines, les anticorps, les antigènes, les aptamères, les phages, les

protéines de phages ; ce sera généralement une capture spécifique des cellules. Dans une variante avantageuse de l'invention, le partenaire de liaison est immobilisé sur le support puis la bactérie capturée par ledit partenaire de liaison immobilisé.

5 L'étape de capture peut être effectuée sur des fractions d'une ou plusieurs bactéries exposées à un antibiotique et sur celle de contrôle, après concentration desdites fractions. Par exemple, on concentre lesdites fractions par centrifugation puis on récupère les culots que l'on soumet à l'étape de capture. De façon avantageuse, la capture est directement réalisée dans l'échantillon biologique sans étape séparée de concentration en culots.

10 Après l'étape de capture, on repère et on trie les bactéries capturées. Cette étape est réalisée par exemple par imagerie ou spectrophotométrie. Les bactéries non capturées peuvent alors être éliminées.

Les conditions d'exposition préférentielles des bactéries à l'antibiotique sont ci-après mentionnées :

15 L'antibiotique est dans un milieu physiologique permettant au moins de maintenir la ou les bactéries d'intérêt vivantes.

L'exposition à l'antibiotique est effectuée à une température de mise en culture des souches considérées, d'environ 18°C à environ 40°C, typiquement entre 28°C et 37°C pour les souches d'intérêt clinique.

20 L'exposition à l'antibiotique est effectuée pendant un temps dit d'incubation très inférieur au temps nécessaire dans les méthodes de référence. Selon l'invention, le temps d'incubation est avantageusement d'au moins 10 minutes et d'au plus 4 heures.

25 L'obtention d'une signature, pour chaque fraction exposée à l'antibiotique, sera illustrée dans les exemples.

De manière générale, plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour traiter les données obtenues pour aboutir au résultat. Afin que celui-ci soit aussi pertinent que possible, une méthode complète de traitement des spectres au niveau individuel est de préférence réalisée. Elle est divisée en deux étapes majeures, une étape de prétraitement qui consiste à traiter les spectres pour maximiser l'extraction d'un signal d'intérêt et une étape de classification qui permet de réaliser le test d'intérêt proprement dit et aboutir au résultat d'intérêt.

L'étape de prétraitement comprend au moins l'une, de préférence deux, et mieux encore l'ensemble des opérations mentionnées ci-dessous :

35 - Suppression des spectres saturés

La suppression des spectres saturés est la première étape de prétraitement des spectres. Elle est réalisée à partir des spectres bruts obtenus. On considère comme saturés les spectres pour lesquels plus de 20% des canaux de la région d'intérêt ont une intensité supérieure à 99% de l'intensité maximale.

5 - Suppression des rayons cosmiques

Les rayons dits « cosmiques » sont des particules chargées de haute énergie, d'origine solaire, galactique ou extragalactique, qui bombardent en permanence le détecteur CCD (Charge-Coupled Device, dispositif à transfert de charge). Ils provoquent des pics de signal très fins qui peuvent apparaître de façon aléatoire dans les spectres. Une recherche de pics est d'abord réalisée à partir du calcul de la dérivée seconde du spectre brut. Une comparaison de cette dérivée seconde et de la dérivée seconde du spectre brut lissé permet ensuite d'identifier les pics très fins pour lesquels le lissage a diminué de façon significative la hauteur du pic, c'est-à-dire les rayons cosmiques. Les pics associés à des rayons cosmiques sont remplacés par une droite.

15 - Réalignement

On a pu constater de légers décalages entre des séries de spectres prises à des dates différentes. Ce décalage est une constante sur l'ensemble du spectre. Il est préférable de le corriger.

20 La méthode consiste à réaligner tous les spectres par rapport à une « référence » constituée par les positions des 2 pics 1001 cm^{-1} et 1126 cm^{-1} . La position des pics des spectres à réaligner est déterminée à partir d'un ajustement des pics par un modèle composé d'une gaussienne sur un fond affine.

Les spectres sur bactéries individuelles ne permettent généralement pas de réaliser un réalignement par spectre (spectres trop bruités). Le réalignement est donc de préférence effectué à partir des spectres moyens des bactéries (après suppression du fond par l'algorithme SNIP). Une comparaison entre la position de 2 pics dans le spectre net moyen à réaligner et les valeurs de référence de ces 2 mêmes pics permet de mesurer le décalage. On applique la correction trouvée à partir des spectres des bactéries aux spectres d'environnement de la même date acquis sur le matériau constituant le support.

30 - Extraction du signal spécifique bactérien

Le fond est soustrait en deux étapes. Un premier fond, constitué d'un spectre moyen du matériau constituant le support, est ajusté par exemple entre 450 et 35 650 cm^{-1} au spectre bactérie dans le cas d'un support en verre car c'est une région où il n'y a que la contribution spectrale du verre. Cet ajustement est réalisé avec la

contrainte de rester sous le spectre bactérie dans cette région. La deuxième étape consiste à soustraire un fond par l'algorithme SNIP.

- Suppression des déviants

Un module de suppression automatique des spectres déviants a été mis au point. Les spectres utilisés dans la recherche de déviants sont les spectres nets normalisés utilisés dans la suite de l'analyse. La recherche de déviants est appliquée à un groupe de spectres correspondant à une souche, une concentration d'antibiotique donnée et une date donnée. La méthode repose sur le calcul de la distance euclidienne entre chaque spectre et le spectre moyen d'un groupe de spectres. Cette suppression des déviants est réalisée deux fois consécutives. Le premier tour permet de supprimer les spectres très aberrants qui ont un effet non négligeable sur le spectre moyen.

- Région d'intérêt et normalisation du signal

Le choix de la région d'intérêt est important car c'est sur cette région que les spectres seront comparés entre eux. Les spectres sont mesurés entre 400 et 3080 cm^{-1} de décalage en énergie. La région d'intérêt retenue est [650-1750] cm^{-1} et/ou [2800-3050] cm^{-1} . Il est indispensable de normaliser les signaux nets afin de pouvoir les comparer directement entre eux. L'intervalle de normalisation utilisé est [650-1750] cm^{-1} ou [2800-3050] cm^{-1} . Le signal net est divisé par la valeur de la moyenne du signal net dans cet intervalle. Il est utile, dans un mode avantageux, de soustraire un état de référence des bactéries à l'ensemble des spectres de bactéries individuelles acquis. L'état de référence utilisé est celui constitué par des spectres issus de S_0 . Cette opération permet de s'affranchir des variations des conditions de croissance, des variations de l'interface I (voir figure 2) et d'extraire un signal appelée signature lié à l'exposition à des concentrations d'agent antibiotique variables.

Comme indiqué précédemment, le procédé trouve un fort intérêt dans son application à la détermination du profil phénotypique clinique d'une bactérie d'intérêt et notamment pour déterminer sa sensibilité ou sa résistance à un antibiotique, et avantageusement déterminer la CMI de ladite bactérie audit antibiotique.

Dans cette indication et pour obtenir un résultat pertinent, on préférera que chaque fraction comprennent au moins 2, de préférence au moins 5, bactéries d'intérêt pour obtenir au moins 2, de préférence au moins 5 signaux.

Selon une variante de l'invention, les bactéries comparées sont sensiblement au même stade de croissance.

De manière générale, un procédé de l'invention peut être mis en œuvre dans un système comportant les éléments suivants :

- Un spectromètre permettant l'analyse Raman de l'échantillon :

5 Le spectromètre Raman utilisé est classiquement qualifié de microspectromètre Raman confocal dans l'état de l'art en ce sens qu'il est constitué d'un étage d'analyse capable de produire un spectre à partir de la lumière résultante de la diffusion Raman après excitation par un laser, le spectromètre Raman, cet étage d'analyse étant couplé à un étage de
10 microscopie confocale permettant de mesurer un spectre Raman à l'aide d'un objectif de microscope et de limiter le volume analysé à un volume restreint spatialement, le volume confocal. L'étage de microscopie du microspectromètre peut également permettre de façon classique l'acquisition d'images par une caméra présente dans le dispositif ou plus simplement par l'observation directe via des oculaires à l'aide d'une source lumineuse intégrée ou non au microspectromètre ;

15 - Un dispositif de conditionnement des micro-organismes pour l'analyse spectrale ; et

- Un ordinateur permettant le pilotage du microspectromètre, le stockage des données collectées et l'analyse de ces données à l'aide d'un logiciel dédié mettant en œuvre les méthodes ci-dessous.

20 Un dispositif de conditionnement des microorganismes tel que mentionné ci-dessus, éventuellement couplé à un spectromètre et à un ordinateur pour la mise en œuvre du procédé de l'invention est aussi un objet de l'invention.

Un système tel qu'abordé précédemment, permettant la mise en œuvre d'un procédé de l'invention est illustré à la figure 1 et sa mise en pratique est effectuée dans les exemples qui suivront. Ils sont ci-après décrits plus en détails :

25 Le système comprend un microspectromètre Raman permettant l'analyse confocale de la lumière diffusée par des objets de la taille des microorganismes (0.5-100 μm), par exemple un spectromètre Aramis de la marque HORIBA équipé d'un objectif de microscope ZEISS de type 100x Plan-Neofluar de référence 44 080. Ce microspectromètre est équipé de moyens de visualisation manuels (oculaires) ou
30 numériques (caméra CCD, par exemple de la marque IDS modèle $\mu\text{eye UI-1240ML}$) permettant l'observation des échantillons en position de mesure. Les paramètres de mesure Raman sont sélectionnés de façon appropriée pour l'objet étudié. Dans les exemples qui suivront, le volume confocal a été adapté pour être proche de la taille d'une bactérie (typiquement un trou confocal de 300 μm sur le modèle d'ARAMIS
35 utilisé) afin de limiter les contributions spectrales non recherchées.

- Le système comprend aussi un dispositif de conditionnement, qui est un objet de

l'invention, dont un mode de réalisation préféré **D** est illustré à la figure 2. Ce dispositif comporte : une pièce **P** comprenant des évidements correspondant à un ensemble de chambres (de **C₁** à **C_N**), **N** étant égal au moins à 2, lesdites chambres étant optionnellement isolables fluidiquement,

5

- un ensemble, optionnel, de ports **P₁** à **P_{2N}** permettant la connexion des chambres fluidiques à un système de gestion des liquides,
- une interface optique **I** fonctionnalisée ou non fonctionnalisée et compatible avec la mesure spectrale sur microorganismes ; et
- 10 - une partie **J**, optionnelle, assurant l'assemblage entre les pièces **I** et **P**.

Selon une variante simplifiée d'un dispositif de conditionnement de l'invention, il peut s'agir d'une lame de microscope standard **I** (25 mm x 75 mm x 1 mm, par exemple de la référence 631-1551 de chez VWR) constituant la pièce **P**, de deux adhésifs double-face faisant office de chambre fluidique (par exemple de la référence AB-0577 de chez Thermo Scientific couramment appelé « Gene Frame ») constituant le joint **J** et une lame couvre objet (par exemple de la référence 0107052 de chez Marienfeld) constituant l'interface **I**.

15

20

25

L'interface **I** peut être fonctionnalisée par une chimie de capture dite « générique » qui sera basée sur des propriétés généralement rencontrées chez les microorganismes en solution ou par une chimie de capture dite « spécifique » et basée sur des propriétés particulières d'une espèce recherchée. Par exemple la chimie de capture « générique » peut être matérialisée par l'absorption sur la lamelle couvre-objet de molécules polycationiques (comme le polyéthylèneimine, la poly-L-lysine ou le chitosan...) et la chimie de capture spécifique peut être matérialisée par l'adsorption ou le couplage de molécules biologiques comme des protéines, des anticorps, des antigènes, des aptamères, des phages ou des protéines de phages, sur la surface de verre afin de permettre la capture d'un microorganisme d'intérêt.

30

Le dispositif de conditionnement assure les conditions physico-chimiques (températures, gaz...) permettant aux microorganismes d'intérêt de présenter une activité métabolique.

Des variantes de ce dispositif **D** sont bien entendu possibles et entrent dans le cadre de la présente invention.

Dans une mise en œuvre préférentielle, les étapes suivantes sont effectuées :

35

- on introduit une solution contenant les microorganismes d'intérêt dans les chambres **C₁** à **C_N**, à l'aide des ports respectifs de connexion fluidique

P_1 à P_N ,

- on respecte un temps dit de latence pour amener les microorganismes d'intérêt à se fixer à la surface I par interaction avec la fonctionnalisation,

5 - on introduit, respectivement, une série croissante de concentrations du composé chimique testé (C_2 à C_N) en solution liquide et une quantité prédéterminée de milieu physiologique dans chaque chambre fluide C_1 à C_N ,

10 - on observe un temps dit d'incubation au cours duquel les microorganismes de chaque chambre sont exposés au composé chimique, à l'exception de ceux de la chambre C_1 (contrôle),

- on assure le repérage et le tri des microorganismes capturés sur la surface I,

15 - on réalise des mesures spectrales Raman sur les microorganismes isolés à l'étape précédente jusqu'à l'obtention d'un ensemble de spectres S_1 à S_N constitués des spectres acquis pour les microorganismes de chacune des chambres fluidiques C_1 à C_N , puis

20 - on effectue une analyse directe des spectres acquis, par comparaison de l'évolution des spectres de C_1 à C_N à une base de données préalablement constituée, ou par la recherche d'une signature spectrale en déterminant le jeu de spectres S_i présentant une évolution significative,

25 - le résultat de l'analyse est constitué par la concentration C_i , la comparaison de C_i à un seuil de référence ou l'expression de l'évolution de certaines caractéristiques des spectres S_i en fonction de la concentration ; il permet de qualifier le comportement phénotypique des microorganismes analysée par rapport au composé testé.

Comme indiqué précédemment et selon l'objectif recherché pour la mesure, plusieurs adaptations peuvent être réalisées (nombre de concentrations testées, temps d'incubation...), le principe général restant identique.

30 Les détails et avantages de l'invention ressortiront des exemples ci-après, à l'appui des figures suivants selon lesquelles :

Figure 1 représente le schéma de principe du montage complet d'un système permettant de mettre en œuvre le procédé de l'invention intégrant un dispositif de l'invention tel qu'illustré à la figure 2.

35 Figure 2 représente le schéma de principe du dispositif de conditionnement des microorganismes, appartenant au système illustré à la

figure 1.

Figure 3 illustre une mise en place des échantillons sur une lamelle de verre du dispositif de conditionnement illustré à la figure 2.

Figure 4 représente une expression de la réaction de la souche d'*Escherichia coli* de référence ATCC 25922, appelée « EC10 », à la gentamicine, obtenue selon le procédé de l'invention.

Figure 5 représente une expression de la réaction de la souche d'*Escherichia coli* de référence ATCC 35421, appelée « EC21 », à la gentamicine, obtenue selon le procédé de l'invention, pour N=5.

Figure 6 représente la matrice de confusion obtenue pour la souche sensible d'*Escherichia coli* de référence ATCC 25922, appelée « EC10 », en présence d'amoxicilline (CMI = 6 µg/mL) pour N=11.

Figure 7 représente la matrice de confusion obtenue pour la souche sensible d'*Escherichia coli* de référence ATCC 35421, appelée « EC21 », en présence d'amoxicilline pour N=11.

Figure 8 représente la matrice de confusion obtenue pour la souche sensible d'*Escherichia coli* de référence ATCC 35421, appelées « EC21 », en présence d'amoxicilline testée avec un classifieur entraîné avec des bactéries exposées à de la gentamicine pour N=11.

Figure 9 illustre les signatures obtenues pour des concentrations de gentamicine de 0 µg/mL, 2 µg/mL et 8 µg/mL.

Figure 10 représente un schéma simplifié du principe proposé en exemple 4.

Figure 11 représente une expression de la réaction d'une souche bactérienne exposé à différentes concentrations de ciprofloxacine, obtenue selon le procédé de l'invention.

Exemple 1 : Application du procédé de l'invention à la détermination du phénotype de sensibilité de la souche d'*Escherichia coli* de référence ATCC 25922 appelée « EC10 » à la gentamicine

Le dispositif de conditionnement retenu est constitué de deux chambres fluidiques et deux concentrations d'antibiotique sont testées : c_0 : « Sans antibiotique » et c_1 : « Test de résistance ».

Soit c_1 , la concentration de la gentamicine : $c_1 = 8 \mu\text{g/mL}$, qui correspond au doublement de la concentration $4 \mu\text{g/mL}$ qui correspond au breakpoint clinique tel que défini par l'EUCAST. L'objectif de ce test est de déterminer si la bactérie est

considérée comme résistante au sens des définitions proposées par l'EUCAST.

Une solution contenant les bactéries à tester est utilisée comme échantillon de test. Cette solution est obtenue par la mise en suspension de 5.10^7 CFU/mL afin de représenter une concentration potentiellement rencontrée dans un échantillon clinique, par exemple un prélèvement urinaire. Cette solution de bactéries est mise en contact avec l'interface I du dispositif fonctionnalisée par l'adsorption de polyéthylèneimine (PEI) (capture générique). Après un temps de capture de 10 minutes permettant aux bactéries de rentrer en contact avec la fonctionnalisation, l'interface I subit un lavage avec une solution d'eau, cette étape optionnelle permettant d'éliminer le surplus de bactéries non capturées encore en solution. Le milieu physiologique retenu dans cet exemple est constitué d'un mélange peu riche de Bouillon TSB-T Trypcase Soja broth (par exemple de la référence 42100 de bioMérieux) et de PBS 10x (par exemple obtenu à partir des comprimés PBS de référence A9162, 0100 de la marque AppliChem) dans un rapport 1:9. Après division en deux fractions de ce milieu physiologique, on ajoute respectivement dans chacune de ces fractions une quantité de gentamicine (par exemple de la référence G1397-10ML de Sigma-Aldrich) permettant d'obtenir une concentration différente de gentamicine c_0 ou c_1 . Les solutions de concentrations c_0 et c_1 ainsi produites sont respectivement introduites dans les chambres C_0 ou C_1 . Les bactéries capturées directement à partir de l'échantillon sur la surface I sont ainsi exposées, dans un milieu adapté, à une concentration d'antibiotique différente selon la chambre dans laquelle elles sont présentes.

Le dispositif est ensuite chauffé pour atteindre une température de 37°C pendant deux heures puis placé en position de mesure sur le microspectromètre. Le repérage des bactéries capturées est effectué par une procédure automatique basée sur l'analyse de l'image, par une procédure classique de détection de particules, acquise au moyen de la caméra du microspectromètre et d'une source de lumière adaptée. Ce repérage permet d'acquérir automatiquement une série de spectres Raman (S_0 et S_1 , respectivement) acquis sur des bactéries individuelles présentes dans chaque chambre C_0 et C_1 . Le nombre de spectres à acquérir pour constituer un jeu de données dépend du niveau d'exigence sur les performances des tests à réaliser.

Comme dit précédemment, plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour traiter les données obtenues pour aboutir au résultat. Dans le présent exemple, on utilise une méthode complète de traitement des spectres au niveau individuel comprenant une étape de prétraitement comprenant l'ensemble des phases décrites précédemment pour maximiser l'extraction d'un signal d'intérêt et la classification.

Dans cet exemple, on utilise un ensemble d'au moins $2N$ spectres extrait de l'ensemble M total des spectres acquis : N spectres issu de S_0 et N spectres issus de S_1 . Ces spectres sont tirés sans remise parmi les M spectres disponibles. On soustrait à chacun des N spectres issus de S_1 et des N spectres issus de S_0 la moyenne des N spectres issus de S_0 , ces deux lots de spectres constituant un « échantillon de test de contrôle » et un « échantillon de test de résistance ».

Pour la classification, on utilise dans le présent exemple une base de données de référence obtenue à partir d'expériences similaires réalisées précédemment à des dates et à partir de cultures différentes pour entraîner un classifieur obtenu à l'aide d'un Machine à Vecteur de Support (SVM) à noyau radial. Ce classifieur est entraîné à reconnaître deux classes, l'une « Sans effet antibiotique » à partir de spectres issus de conditions sans antibiotique et l'autre « Effet antibiotique » à partir de spectres préalablement acquis dans des conditions où la concentration est supérieure à la CMI de la ou des souches utilisées dans la base de référence. Pour chaque échantillon de tests constitués de N spectres de différence, on teste individuellement ces spectres de différence par rapport au classifieur et on attribue au groupe de N spectres la classe majoritaire parmi les éléments des groupes. Cette attribution à la majorité est basée sur la bonne corrélation des résultats ainsi obtenus avec les méthodes de référence mais peut tout à fait être modifiée pour prendre en compte certains autres paramètres des tests. Par exemple un vote à seuil différent de la majorité où dès que le nombre de bactéries ne présentant aucun effet dépasse les 30% alors on attribue de façon conservatrice un résultat « Sans effet antibiotique ». On pourra également ajuster ce seuil pour prendre en compte le temps d'incubation : ainsi par exemple si on réduit de façon notable le temps d'exposition aux antibiotiques, ou que le microorganisme testé présente un temps de doublement typique plus lent, prendre en compte un seuil plus bas pour attribuer un résultat « effet antibiotique » à ce groupe de spectres. Enfin on pourrait également adopter un système plus nuancé où chaque bactérie est considérée de façon totalement individuelle. Ce dernier mode de réalisation peut-être avantageux si la méthode de la présente invention est utilisée à des fins de recherche.

Afin d'illustrer les performances ainsi obtenues, le score moyen obtenu pour tous les résultats qui seraient obtenus avec une combinaison de 5 spectres par concentration ($N=5$) parmi un jeu total de spectres total acquis 294 spectres ($M=294$) est présenté à la figure 4. Cette matrice présente en colonne les états « Sans effet ATB » et « Effet ATB » et en ligne les deux concentrations d'antibiotiques testés. Le score indique le pourcentage des échantillons de test qui sont attribués à une classe

donnée par le classifieur décrit précédemment. Ainsi on constate que 99% des échantillons de N=5 bactéries de l'« échantillon de test de contrôle » sont classés « Sans effet antibiotique » et que 97,1% des « échantillons de test de sensibilité » constitués par des bactéries exposées à la concentration de test sont classés « Effet ATB ». La souche peut donc être qualifiée de sensible selon l'invention avec une grande confiance sur la base de seulement quelques analyses de bactéries individuelles. Le résultat est conforme aux méthodes de référence (test bioMérieux ou vitek bioMérieux) qui donnent pour résultat une CMI=1µg/mL ce qui confirme bien que la bactérie n'est pas résistante au sens de l'EUCAST, sa CMI n'étant pas strictement supérieure au seuil défini par cet organisme.

Exemple 2 : Application du procédé de l'invention à la détermination du phénotype de sensibilité de la souche d'*Escherichia coli* de référence ATCC 35421 appelée « EC21 » à la gentamicine

Un test identique à celui de l'exemple 1 est mené pour une autre souche d'*Escherichia coli*, la souche ATCC 35421 appelée « EC21 » permet de confirmer le caractère discriminant de la mesure.

Les résultats sont présentés à la figure 5.

Les méthodes de référence attribue une CMI>256µg/mL à cette souche qui est donc résistante au sens de l'EUCAST.

La méthode de l'invention confirme ce résultat puisque dans le cas N=5 et M=133, on lit que 100% des tests effectués ne présentent pas de profil caractéristique d'effet de l'agent antibiotique.

Exemple 3 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de deux souches d'*Escherichia coli* à l'amoxicilline

Dans cet exemple, on cherche à déterminer le phénotype de sensibilité, et à préciser un encadrement de la concentration minimale inhibitrice de la souche d'*Escherichia coli* de référence ATCC 25922 appelé « EC10 » pour un antibiotique, l'amoxicilline, possédant un mode d'action différent que celui proposé dans les exemples 1 et 2.

Afin d'illustrer le pouvoir discriminant de cette méthode, le même test est réalisé pour une souche résistante à l'amoxicilline d'*Escherichia coli* ATCC 35421 appelé « EC21 » est aussi présenté.

Les concentrations suivantes d'amoxicilline ont été testées.

EC10 souche sensible (CMI_{REF}=6µg/mL) :

0 µg/mL ; 2 µg/mL ; 4 µg/mL ; 8 µg/mL et 16 µg/mL

EC21 souche résistante ($CMI_{REF}=256\mu\text{g/mL}$) :

0 µg/mL ; 4 µg/mL et 8 µg/mL.

5 Dans cet exemple, un autre mode de réalisation du test proposé correspondant à la méthode alternative décrite est illustré.

10 Une solution contenant les bactéries à tester, EC10 ou EC21, est utilisée comme échantillon de test. Cette solution est obtenue par la mise en suspension dans l'eau de $5 \cdot 10^7$ CFU/mL afin de représenter une concentration potentiellement rencontrée dans un échantillon clinique, par exemple un prélèvement urinaire. Cette solution de bactéries est répartie dans 5 tubes à filtre (par exemple Microcon YM100 de Millipore) à raison de 150 µL par tube. On ajoute à chacun de ces tubes une quantité suffisante pour 250 µL finaux de milieu physiologique permettant la croissance constitué dans cet exemple d'un mélange de PBS de concentration finale 1x (obtenu à partir des comprimés PBS de référence A9162,0100 de la marque
15 AppliChem), de milieu nutritif TSB 0.1X (par exemple obtenu à partir de Bouillon TSB-T Trypcase Soja broth de référence 42100 de bioMérieux) et d'une quantité d'amoxicilline permettant d'aboutir à des concentrations finales respectives c_0 à c_4 d'amoxicilline (par exemple la référence A8523-10ML de Sigma-Aldrich) comme suit :

- $c_0=0\mu\text{g/mL}$
- 20 • $c_1=2\mu\text{g/mL}$
- $c_2=4\mu\text{g/mL}$
- $c_3=8\mu\text{g/mL}$
- $c_4=16\mu\text{g/mL}$

Les 5 tubes ainsi obtenus sont incubés pendant 2 heures à 37°C sous agitation.
25 Une centrifugation, à 1200g pendant 8 minutes à l'aide d'une centrifugeuse adaptée aux contenants utilisés (par exemple le modèle 8415C de la marque Eppendorf) permet alors de récupérer un culot bactérien sur la partie filtre de chaque tube et d'éliminer le milieu. Les culots bactériens sont respectivement resuspendus en eau pour effectuer un lavage avant d'être à nouveau culotés par centrifugation (1200g
30 pendant 10 minutes) toujours sur la partie filtre du tube. Ces culots sont répartis sur une lame de verre de type Marienfield constituant l'interface I (non fonctionnalisé dans cette configuration) à l'aide d'un écouvillon dans des chambres correspondantes noté C_0 à C_4 . Dans cette configuration, les chambres ne sont pas nécessairement isolées d'un point de vue physique puisqu'aucun échange n'est possible entre les
35 différentes conditions. Il est ainsi possible d'utiliser une lamelle de verre dont des compartiments virtuels sont clairement identifiés pour chaque concentration tel que

présenté à la figure 3. Les compartiments virtuels sont définis par des délimitations matérialisées dans le présent exemple par un marquage préalablement effectué sur la lamelle du côté opposé à celui où sont déposées les bactéries. La lame de verre est ensuite déposée sur un « geneframe » constituant le joint J dans le dispositif de conditionnement précédemment décrit.

Le repérage des bactéries capturées est effectué par une procédure manuelle dans cet exemple basée sur l'analyse visuelle par l'opérateur de l'image acquise au moyen de la caméra du microspectromètre et d'une source de lumière adaptée par un expérimentateur. Ce repérage permet d'acquérir une série d'au moins N spectres Raman acquis sur des bactéries individuelles présentes respectivement dans chaque chambre C_0 à C_4 . Le nombre de spectres à acquérir pour constituer un jeu de données dépend du niveau d'exigence sur les performances des tests à réaliser.

Le mode de traitement de données proposé ici est identique à celui des exemples 1 et 2 : une première étape de prétraitement suivie d'une étape de classification des spectres acquis à l'aide d'un classifieur préalablement entraîné. Dans les exemples proposés ci-dessous le classifieur est entraîné avec une base de référence contenant des spectres « Sans effet antibiotique » préalablement acquis dans une condition sans antibiotique ($0\mu\text{g/mL}$) d'amoxicilline de bactéries EC10 et de spectres « Effet antibiotique » de bactéries EC10 en présence de $8\mu\text{g/mL}$ d'amoxicilline. Les résultats obtenus sont présentés dans la matrice de confusion proposée en figure 6. Comme précédemment cette matrice permet de démontrer la robustesse de la méthode en donnant les résultats pour un grand nombre de tests.

On observe une transition dans l'attribution des groupes de spectres de la catégorie « Sans effet ATB » vers la catégorie « Effet antibiotique » entre les concentrations $4\mu\text{g/mL}$ et $8\mu\text{g/mL}$. On peut donc attribuer à cette souche une CMI comprise entre $4\mu\text{g/mL}$ et $8\mu\text{g/mL}$ selon les essais. Cette variabilité à un facteur de dilution près est très fréquente dans ce type d'essai, l'EUCAST indique par exemple des gammes de variations de CMI de $[2-8]\mu\text{g/mL}$ pour cette souche ATCC 25922 lors des contrôles qualité des tests de CMI en diffusion par disque, et est donc conforme avec des résultats attendus. Le résultat établi par les méthodes de référence est de $6\mu\text{g/mL}$ pour cette souche ce qui est également conforme avec ce résultat.

Le même type d'expérience réalisé sur la souche « EC21 » résistante à l'amoxicilline donne les résultats présentés à la figure 7. Aucune transition n'est observée et la très grande majorité des groupes mesurés est attribuée à la catégorie « Sans effet ATB ». On peut donc attribuer une $\text{CMI} > 8\mu\text{g/mL}$ à cette souche avec ce test ce qui est également conforme avec les résultats obtenus par la méthode de

référence.

Comme le montre la figure 8, des résultats identiques sont obtenus en entraînant le classifieur sur une base de référence contenant à nouveau des spectres de bactéries non exposées à des antibiotiques pour reconnaître la classe « Sans effet
5 ATB » et des spectres de bactéries « Effet antibiotique » exposés à une concentration supérieure à la CMI d'une autre molécule antibiotique appartenant à une famille différente, par exemple la gentamicine de l'exemple précédent.

On retrouve des résultats similaires à ceux exposés précédemment. Cet exemple prouve qu'il est possible d'effectuer la recherche de l'effet antibiotique d'une
10 substance inconnue sur la souche bactérienne testée de cette manière et pourrait donc être appliqué au criblage de molécule.

Exemple 4 : Détermination de l'effet d'une substance inconnue sur une souche bactérienne.

15 Dans cet exemple, on cherche à déterminer le phénotype de sensibilité, et à préciser un encadrement de la concentration minimale inhibitrice, d'une souche bactérienne, par exemple, des souches d'*Escherichia coli* de référence ATCC 25922 appelée « EC10 », pour une substance réputée inconnue.

Pour les besoins du test, on utilise une molécule antibiotique connue mais
20 n'appartenant pas aux familles antibiotiques précédemment utilisées : la ciprofloxacine de la famille des fluoroquinolones.

Le mode de réalisation de l'exemple précédent est utilisé pour cet exemple. Seuls les résultats obtenus pour les 4 premières concentrations seront explicitement illustrés car un effet antibiotique est rapidement détecté pour cette molécule. Une
25 série de N spectres Raman est acquis dans chacune des chambres de C_0 à C_3 . Les concentrations c_0 à c_3 utilisées sont les suivantes :

- $c_0=0\mu\text{g/mL}$
- $c_1=0,005\mu\text{g/mL}$
- $c_2=0,015\mu\text{g/mL}$
- 30 • $c_3=0,064\mu\text{g/mL}$

Comme précédemment, les étapes réalisées pour effectuer le prétraitement des spectres sont les suivantes :

- la suppression des spectres saturés
- la suppression des rayons cosmiques
- 35 • le réalignement
- l'extraction du signal spécifique bactérien

- la suppression des déviants
- la région d'intérêt et la normalisation du signal

Pour effectuer un test, on réalise une moyenne de N spectres acquis pour chaque concentration testée et on soustrait au résultat une moyenne de N spectres de la concentration c_0 . Pour la concentration c_0 on choisit N spectres différents des N spectres utilisés pour la soustraction de l'état de référence. Cette opération a pour objectif de s'affranchir au maximum de toutes variations qui ne soient pas corrélées à l'exposition à l'antibiotique, dans les conditions de mesures. On obtient ainsi une série de 4 spectres de tests représentatifs de chaque concentration.

10 Dans cet exemple on choisit d'utiliser une méthode de classification non supervisée qui repose sur la recherche et l'utilisation d'au moins une signature spectrale caractéristique d'un effet antibiotique. Pour identifier cette signature, on utilise un jeu de données préalablement acquis pour la gentamicine et la souche EC10 dont on connaît la CMI ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) pour cet antibiotique. On utilise le jeu de données
15 constitué par les N spectres prétraités acquis sur des bactéries exposées à l'une des concentrations (ou plusieurs) supérieure à la CMI pour extraire un effet caractéristique. On effectue une moyenne de l'ensemble des N (ou $n*N$) spectres du jeu de données et l'on soustrait au résultat la moyenne de N spectres acquis en l'absence d'antibiotique. Ce résultat est qualifié de signature de référence. C'est cette
20 signature de référence qui est retenue pour qualifier les données acquises en exposant des bactéries à la ciprofloxacine, réputée inconnue dans ce cas.

Le jeu de signature ainsi construit est présenté en figure 9. Les deux signatures obtenues pour les concentrations c_1 et c_3 sont similaires : les mêmes pics sont modifiés mais l'intensité est ici corrélée à la concentration. Il est à remarquer que
25 cette différence d'intensité pourrait servir à quantifier l'impact d'une concentration donnée mais uniquement dans certaines configurations souche/antibiotique.

On va utiliser la signature extraite à partir de la concentration $8\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicine pour analyser les 3 jeux de spectres de tests. Pour ce faire on évalue la proximité de chaque spectre de tests par rapport à la signature choisie. L'évaluation
30 de la distance entre le spectre testé et la signature sera faite dans cet exemple à l'aide d'une simple distance euclidienne dans l'espace des spectres mais de nombreuses autres distances permettent d'évaluer cette proximité (Mahalanobis, L1...). Un seuil est défini empiriquement par rapport à d'autres expériences de référence identiques réalisées précédemment, le choix de ce seuil peut-être optimisé par des méthodes
35 classiques (ROC...) selon le niveau de résultat exigé qui peut notablement différer entre les applications (diagnostic IVD, criblage pharmaceutique...). On compare alors

la mesure de distance obtenue à cette valeur de seuil pour définir la proximité entre la signature retenue et les spectres de différence acquis en présence des différentes concentrations de la molécule réputée inconnue. Si la distance est inférieure au seuil, le test est positif et l'on a détecté un effet de la molécule antibiotique. Si la distance est supérieure à ce seuil alors aucun effet n'est détecté.

Dans un mode avantageux on peut mettre en place plusieurs seuils de détection de plus en plus stricts. Dans cet exemple, on utilise deux seuils selon ce principe : le premier, moins strict, permet de détecter une variation significative des spectres testés alors que le second, plus strict, permet de qualifier une grande proximité de la modification avec la signature. On effectue donc un test de la distance du spectre testé à la signature par rapport au premier seuil. Si le test n'est pas passé, alors aucun effet n'est détecté. Si le test est passé, la distance mesurée est inférieure au premier seuil, alors un effet est détecté. On effectue alors un second test en utilisant le second seuil et si ce test est passé, on attribue le résultat « Effet antibiotique » au test complet. Si ce second test n'est pas passé on attribue alors le résultat « Autre effet » au test complet. Cette configuration permet de détecter facilement des modifications spectrales arrivant à une concentration donnée mais ne présentant pas de similarité suffisante avec la signature de référence. Cette configuration permet donc simplement de s'affranchir d'une partie des éventuels aléas survenant pendant un test (inhomogénéité forte de la surface de capture, présence de particules parasites...). Un schéma simplifié est présenté en figure 10.

Une autre façon de réaliser un test équivalent serait d'effectuer un test en utilisant directement la norme, euclidienne ou autre, du spectre testé et de la comparer à un seuil de significativité choisi pour ne pas prendre en compte les variations classiques liées au mode de mesure (niveau de bruit du capteur, variabilité biologique,...) et d'effectuer ensuite le test à un seul seuil strict. Si la norme dépasse un certain seuil alors le spectre est significativement différent d'un spectre de différence quasi-nul si l'on n'avait pas de modifications à la concentration et l'on peut ensuite le comparer façon stricte à la signature de référence, par exemple en mesurant sa distance à la signature au sens de la norme utilisée.

On obtient les résultats présentés dans la figure 11. On observe ainsi la détection d'un effet pour des concentrations supérieures à $0,005\mu\text{g/mL}$. On peut ainsi donc attribuer un effet antibiotique de la ciprofloxacine sur la souche testée pour des concentrations supérieures à $0,005\mu\text{g/mL}$. Ce test définirait donc une concentration de $0,005\mu\text{g/mL}$ comme CMI. Un nouveau test pourrait éventuellement être effectué en ajoutant de plus faibles concentrations entre 0 et $0,005\mu\text{g/mL}$ si nécessaire. Les

données EUCAST pour cette souche, indique une CMI connue de 0,008 μ g/mL et une plage de variation acceptable de 0,004 μ g/mL à 0,016 μ g/mL. Un test effectué avec un etest (bioMérieux) adéquat permet de mesurer une CMI de 0,008 μ g/mL ce qui confirme que le résultat obtenu est conforme aux méthodes de référence.

REVENDECATIONS

1. Procédé de détermination de la réaction d'au moins une bactérie d'intérêt à son exposition à un antibiotique mettant en œuvre une analyse par spectroscopie Raman et comprenant les étapes suivantes :

5 On dispose d'un échantillon biologique susceptible de contenir lesdites bactéries d'intérêt,

On prépare au moins deux fractions dudit échantillon comprenant chacune une ou plusieurs bactéries d'intérêt vivantes,

10 On capture dans chaque fraction au moins une bactérie d'intérêt vivante à l'aide d'un partenaire de liaison,

On expose au moins l'une des fractions à au moins une concentration d'au moins un antibiotique donné, l'autre des fractions étant la fraction de contrôle,

15 On soumet la ou les bactérie(s) d'intérêt contenue(s) dans les fractions à une lumière incidente et on analyse la lumière résultante obtenue par diffusion Raman par la ou les bactérie(s) d'intérêt par spectroscopie Raman pour obtenir autant de spectres Raman que de bactéries,

On traite lesdits spectres pour obtenir une signature de la réaction de la ou de chacune des bactérie(s) d'intérêt à l'exposition dudit antibiotique et du contrôle,

20 On compare la signature ainsi obtenue par bactérie d'intérêt, à une base de référence définie dans les mêmes conditions que ci-dessus, pour différentes bactéries et au moins ledit antibiotique, et

On définit un profil clinique de sensibilité de ladite bactérie d'intérêt audit antibiotique.

25 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on prépare plus de deux fractions dudit échantillon et on expose au moins deux fractions à des concentrations croissantes, respectivement, dudit antibiotique.

30 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que les concentrations de l'antibiotique auxquelles la ou les fractions sont respectivement exposées, sont comprises dans un intervalle de valeurs incluant au moins une valeur choisie ou des valeurs formants au moins un intervalle encadrant au moins une valeur choisie parmi des valeurs caractéristique d'un couple antibiotique/espèce tel que le cut-off épidémiologique, le ou les breakpoints clinique ou des panels de concentrations utilisés dans les méthodes de référence.

35 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la ou les bactérie(s) d'intérêt présentes dans les fractions sont capturées par un partenaire de liaison qui est immobilisé directement ou indirectement sur un support.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le partenaire de liaison est susceptible d'interagir spécifiquement avec la ou les bactérie(s) d'intérêt et est de préférence choisi parmi les protéines, les anticorps, les antigènes, les aptamères, les phages, les protéines de phages.
- 5 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'on repère et on trie les bactéries capturées, par exemple par imagerie ou spectrophotométrie.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que, avant de soumettre la ou les bactéries d'intérêt à une lumière incidente, on élimine les bactéries n'ayant pas été capturées.
- 10 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'on élimine les bactéries, avant ou après l'étape d'exposition à l'antibiotique.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que, après l'étape d'exposition des fractions, on concentre lesdites fractions et la fraction de contrôle puis on les soumet à l'étape de capture.
- 15 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'antibiotique est dans un milieu physiologique permettant au moins de maintenir la ou les bactéries d'intérêt vivantes.
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'exposition à l'antibiotique est effectuée à une température d'au moins 18°C et d'au plus 40°C.
- 20 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'exposition à l'antibiotique est effectuée pendant un temps dit d'incubation d'au moins 10 minutes et d'au plus 4 heures.
- 25 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que, pour obtenir ladite signature, pour chaque fraction exposée à l'antibiotique, on soustrait le ou les spectres Raman du prélèvement de contrôle aux spectres Raman respectivement desdits prélèvements.
14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'on détermine le statut Sensible, Intermédiaire ou Résistant de la souche d'intérêt audit antibiotique.
- 30 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'on détermine la concentration minimale inhibitrice (CMI) de ladite souche audit antibiotique.
16. Procédé selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce que chaque fraction comprend au moins 2, de préférence au moins 5, bactéries d'intérêt pour obtenir au moins 2, de préférence au moins 5 signaux.
- 35

FIGURE 1

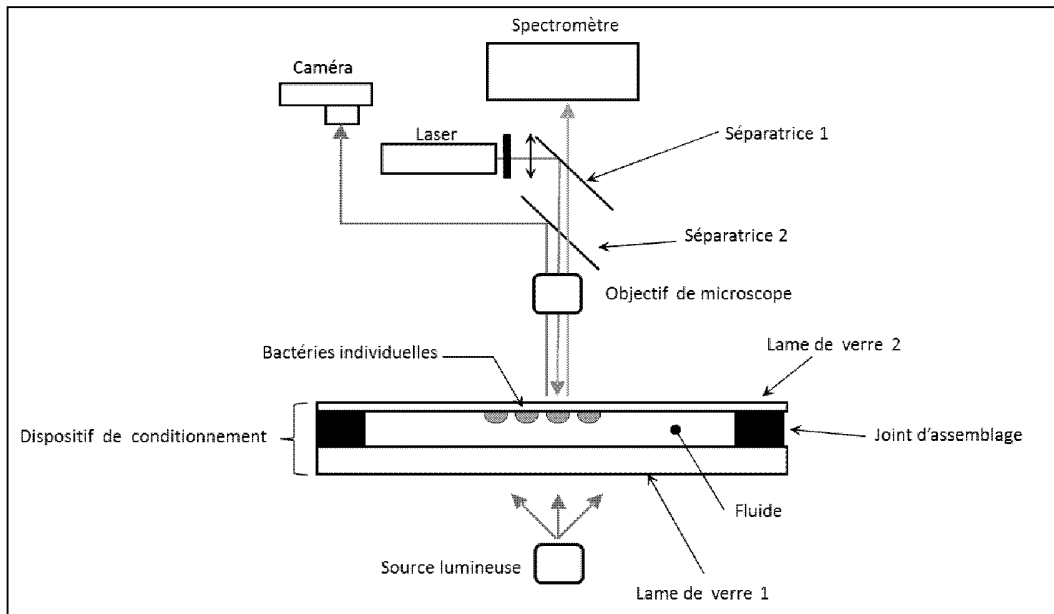


FIGURE 2

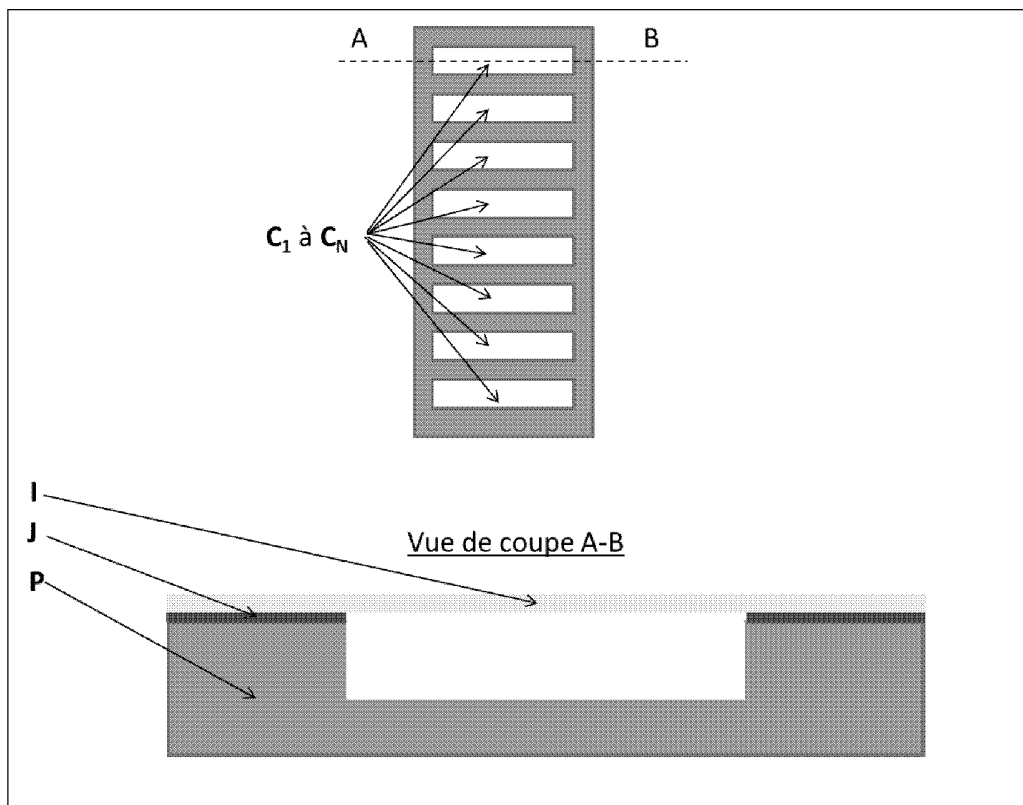


FIGURE 3

C ₀	C ₁
C ₂	C ₃
C ₄	C ₅

FIGURE 4

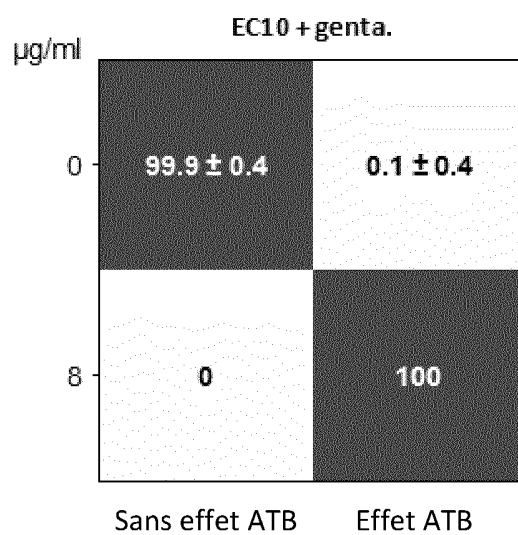


FIGURE 5

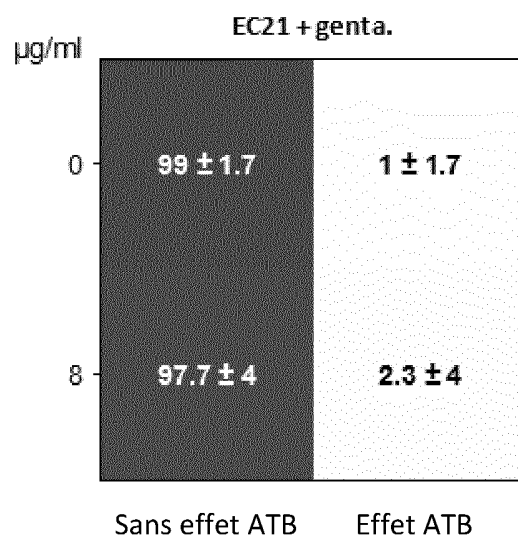


FIGURE 6

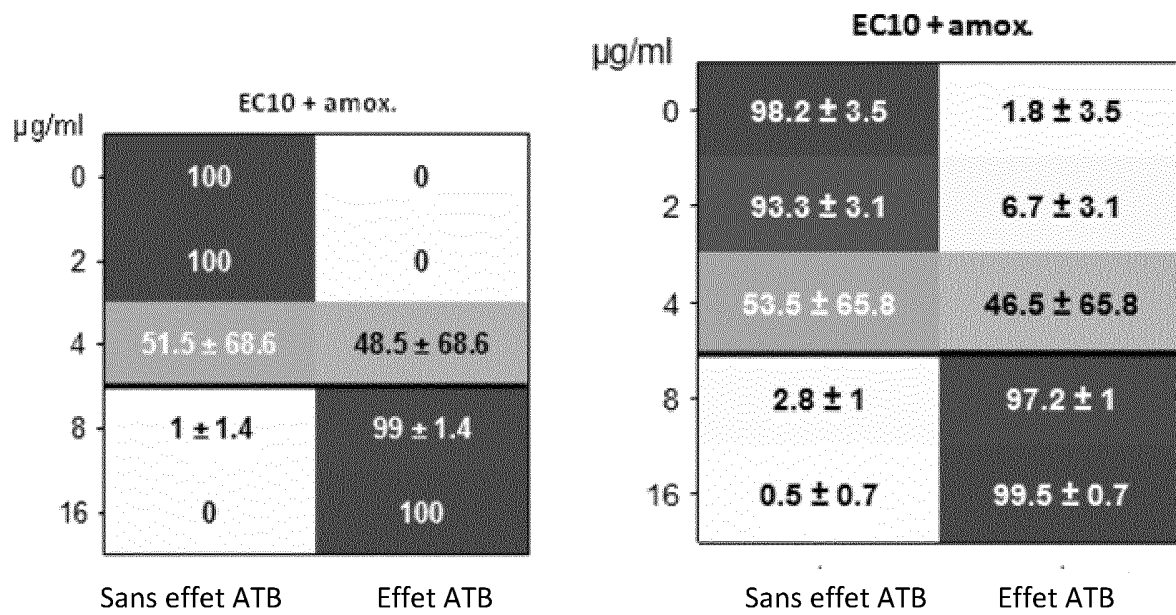


FIGURE 7

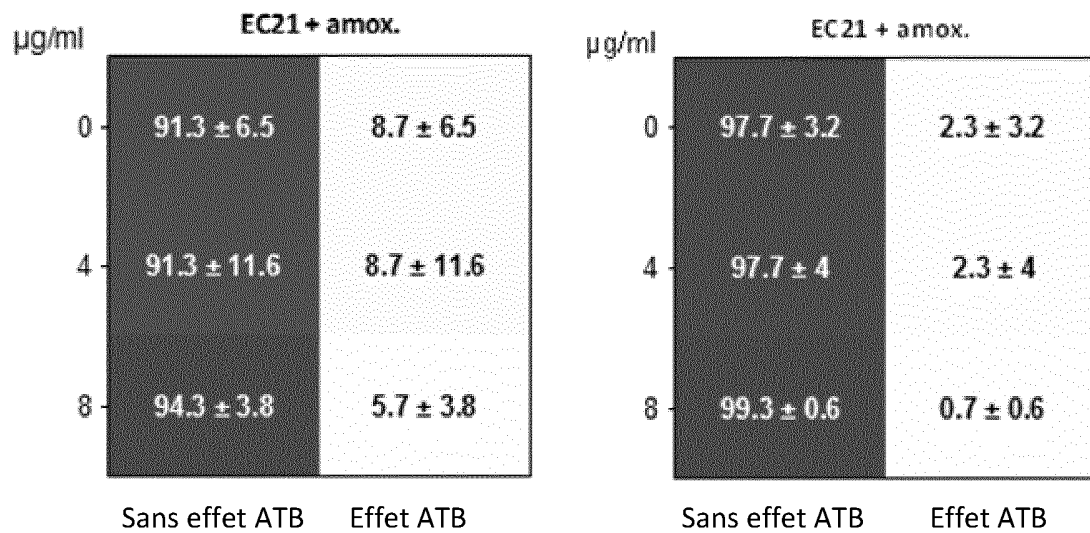


FIGURE 8

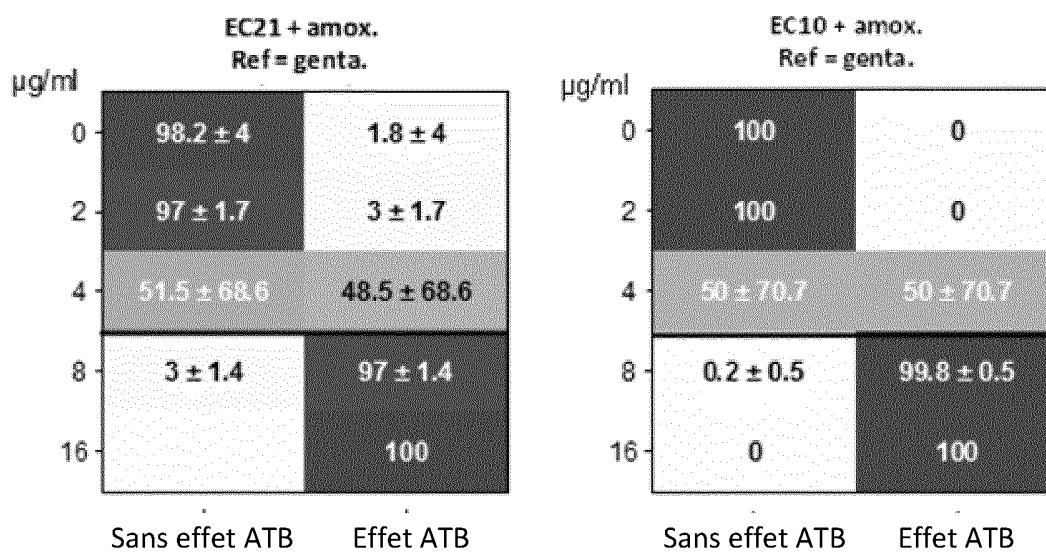


FIGURE 9

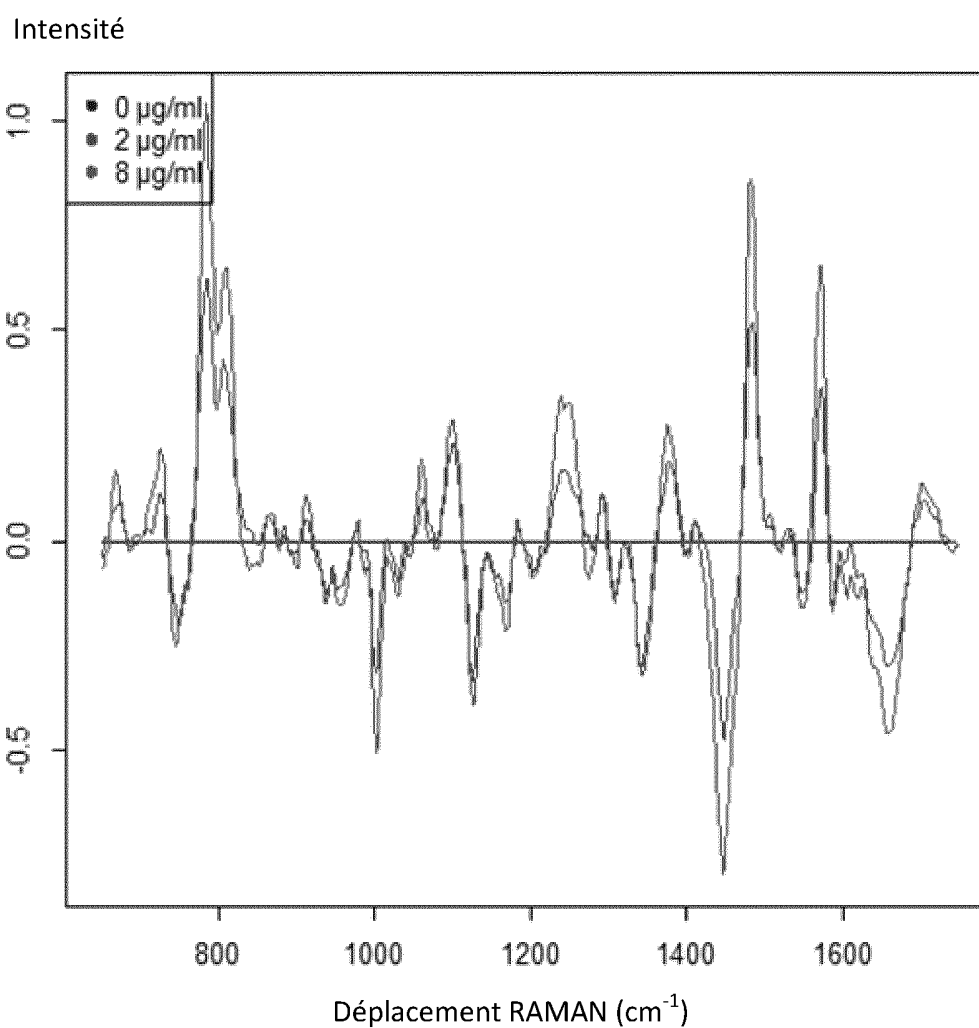


FIGURE 10

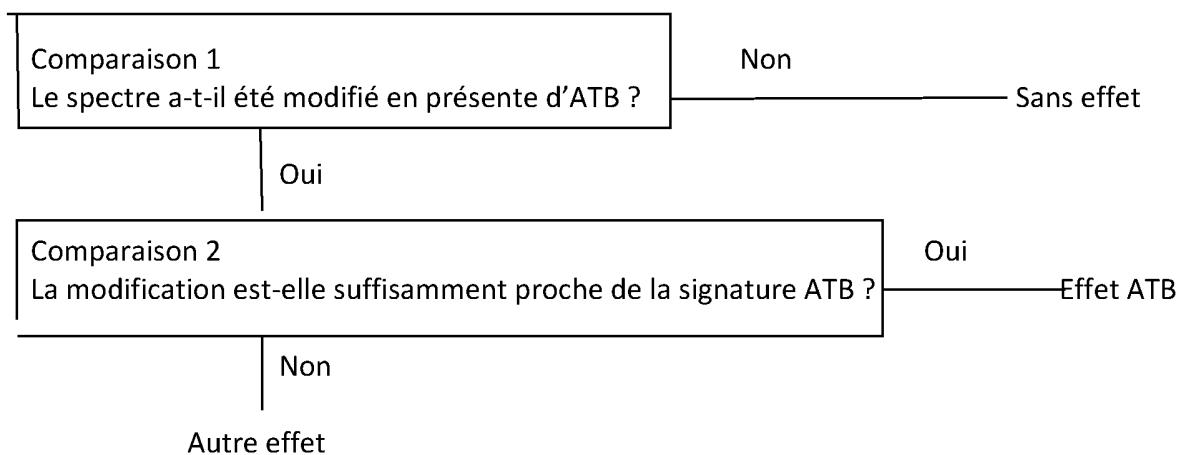
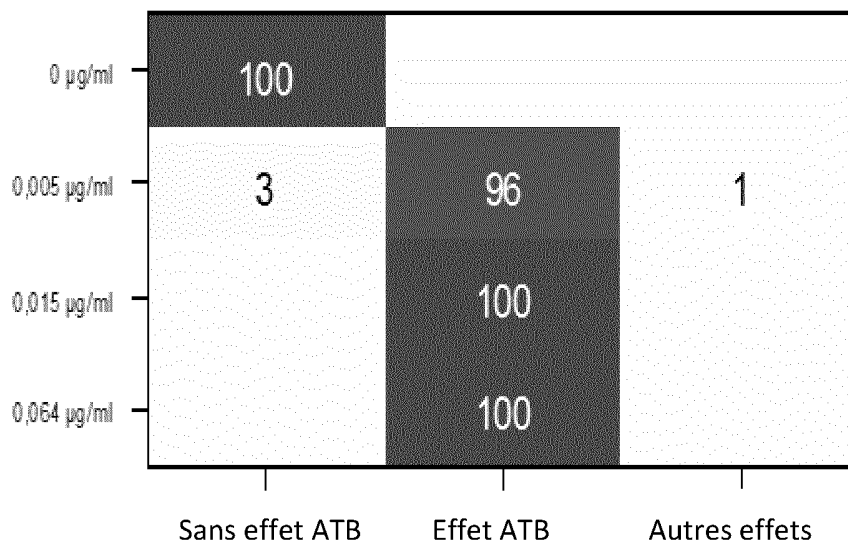


FIGURE 11




**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**
N° d'enregistrement
national
 établi sur la base des dernières revendications
dépôtées avant le commencement de la recherche

 FA 818657
FR 1561446

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	TING-TING LIU ET AL: "A High Speed Detection Platform Based on Surface-Enhanced Raman Scattering for Monitoring Antibiotic-Induced Chemical Changes in Bacteria Cell Wall", PLOS ONE, vol. 4, no. 5, 7 mai 2009 (2009-05-07), pages e5470-e5470, XP055087067, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0005470 * figures 4, 5 et la description correspondante *	1-16	G01N21/65 C12Q1/02 DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) G01N C12Q G01J
A	WO 03/042406 A2 (SYNTHON KG [DE]; LABISCHINSKI HARALD [DE]; SCHIFFER GUIDO [DE]; SCHMIT) 22 mai 2003 (2003-05-22) * page 5, ligne 19 - page 24, ligne 31 * * figures 1-12 *	1-16	
A	ASSMANN CORA ET AL: "Identification of vancomycin interaction withEnterococcus faecaliswithin 30 min of interaction time using Raman spectroscopy", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, DE, vol. 407, no. 27, 1 août 2015 (2015-08-01) , pages 8343-8352, XP035600866, ISSN: 1618-2642, DOI: 10.1007/S00216-015-8912-Y [extrait le 2015-08-01] * figure 2 et la description correspondante *	1-16	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		21 juillet 2016	Sauerer, Christof
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)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 818657
FR 1561446

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	KAI ZHAO ET AL: "Fabrication of silver-decorated sulfonated polystyrene microspheres for surface-enhanced Raman scattering and antibacterial applications", RSC ADV., vol. 5, no. 85, 10 août 2015 (2015-08-10), pages 69543-69554, XP055289596, DOI: 10.1039/C5RA11643K * le document en entier * -----	1-16	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	PAUL R. CAREY ET AL: "New techniques in antibiotic discovery and resistance: Raman spectroscopy", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 1354, 14 août 2015 (2015-08-14), pages 67-81, XP055289656, US ISSN: 0077-8923, DOI: 10.1111/nyas.12847 * le document en entier * -----	1-16	
A	UTE MÜNCHBERG ET AL: "Raman spectroscopic identification of single bacterial cells under antibiotic influence", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 406, no. 13, 21 mars 2014 (2014-03-21), pages 3041-3050, XP055289930, DE ISSN: 1618-2642, DOI: 10.1007/s00216-014-7747-2 * le document en entier * ----- -/--	1-16	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
21 juillet 2016		Sauerer, Christof	
<p align="center">CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement
national

FA 818657
FR 1561446

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, des parties pertinentes		
A,D	A. I. M. ATHAMNEH ET AL: "Phenotypic Profiling of Antibiotic Response Signatures in Escherichia coli Using Raman Spectroscopy", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 58, no. 3, 2 décembre 2013 (2013-12-02), pages 1302-1314, XP055290095, US ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.02098-13 * le document en entier * -----	1-16	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	E. CONSUELO LÓPEZ-DÍEZ ET AL: "Monitoring the Mode of Action of Antibiotics Using Raman Spectroscopy: Investigating Subinhibitory Effects of Amikacin on Pseudomonas aeruginosa", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 77, no. 9, 1 mai 2005 (2005-05-01), pages 2901-2906, XP055188604, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac048147m * le document en entier *	1-16	
A	US 2013/052636 A1 (VERMA RAVI KANT [US] ET AL) 28 février 2013 (2013-02-28) * figures 8, 16 * * alinéa [0111] - alinéa [0114] * * alinéa [0133] - alinéa [0140] *	1-16	
A	GYEONG BOK JUNG ET AL: "Evaluation of antibiotic effects on Pseudomonas aeruginosa biofilm using Raman spectroscopy and multivariate analysis", BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS, vol. 5, no. 9, 28 août 2014 (2014-08-28), page 3238, XP055290203, United States ISSN: 2156-7085, DOI: 10.1364/BOE.5.003238 * le document en entier * -----	1-16	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
21 juillet 2016		Sauerer, Christof	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1561446 FA 818657**

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 21-07-2016

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 03042406 A2	22-05-2003	AU 2002350692 A1	26-05-2003
		CA 2466703 A1	22-05-2003
		DE 10155185 A1	22-05-2003
		DK 1444358 T3	23-11-2009
		EP 1444358 A2	11-08-2004
		ES 2331694 T3	13-01-2010
		JP 4333948 B2	16-09-2009
		JP 2005509847 A	14-04-2005
		US 2005123917 A1	09-06-2005
		WO 03042406 A2	22-05-2003
US 2013052636 A1	28-02-2013	AU 2012298940 A1	12-12-2013
		CA 2843752 A1	28-02-2013
		CN 103733050 A	16-04-2014
		EP 2748588 A1	02-07-2014
		JP 2014520575 A	25-08-2014
		KR 20140031291 A	12-03-2014
		RU 2013150539 A	20-05-2015
		US 2013052636 A1	28-02-2013
		WO 2013028706 A1	28-02-2013