

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①1 N° de publication : **3 025 802**

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

②1 N° d'enregistrement national : **14 02077**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 12 M 1/00 (2014.01), C 12 M 1/34**

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 DISPOSITIF BIOREACTEUR ANAEROBIE AVEC MODULE D'OBSERVATION ESCAMOTABLE.

②2 Date de dépôt : 16.09.14.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 18.03.16 Bulletin 16/11.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 27.12.19 Bulletin 19/52.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : *CNRS Etablissement public à
caractère scientifique technique et industriel —FR et
UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE - UBO
ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE
SCIENTIFIQUE, CULTUREL ET PROFESSIONNEL —
FR.*

⑦2 Inventeur(s) : JEBBAR MOHAMED, BEAUVERGER
MICKAEL, L'HARIDON STEPHANE et MICHOU
GREGOIRE.

⑦3 Titulaire(s) : *CNRS Etablissement public à caractère
scientifique technique et industriel, UNIVERSITE DE
BRETAGNE OCCIDENTALE - UBO
ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE
SCIENTIFIQUE, CULTUREL ET PROFESSIONNEL.*

⑦4 Mandataire(s) : OUEST VALORISATION.

FR 3 025 802 - B1



DISPOSITIF BIOREACTEUR ANAEROBIE AVEC MODULE D'OBSERVATION ESCAMOTABLE.

5 1. Domaine de l'invention.

L'invention se rapporte au domaine des équipements de culture et d'études de micro-organismes en milieux extrêmes et plus particulièrement à aux dispositifs bioréacteurs anaérobies.

10

2. Etat de l'art.

La biosphère océanique profonde représente l'écosystème le plus vaste de notre planète. Elle se caractérise par des conditions physiques et chimiques extrêmes et notamment par des fortes pressions hydrostatiques. Des procaryotes, organismes unicellulaires dépourvus de noyau, de différents types métaboliques ont été isolés de différents types d'environnement, froids, tièdes et chauds. Très peu sont piézophiles, c'est-à-dire n'étant adaptés qu'à vivre en pression hyperbare, avec des très grands niveaux de pression, de l'ordre de plusieurs centaines de bars.

Des organismes piézophiles appartiennent aux domaines du vivant Archaea et Bacteria. Parmi les soixante procaryotes piézophiles isolés à ce jour, plus de 88% sont des bactéries psychrophiles. Des travaux de recherche ont permis d'arriver à l'isolement de procaryotes piézophiles hyper/thermophiles. En 1999, a été isolée l'archée hyperthermophile piézophile *Thermococcus barophilus*. En 2002, c'est l'unique bactérie thermophile et piézophile *Marinitoga piezophila* qui a été obtenue en culture pure par une équipe de recherche et, enfin, en 2009, a été isolée la première et l'unique archée hyperthermophile piézophile stricte *Pyrococcus yayanosii* CH1. La présence des procaryotes piézophiles dans les environnements chauds et froids des fonds océaniques pose des questions relatives à leur métabolisme et à des physiologies particulières leur permettant de jouer un

rôle dans les cycles biogéochimiques des environnements océaniques profonds, leur processus d'évolution et d'adaptation, ainsi qu'aux mécanismes d'adaptation à la pression.

5 L'étude des mécanismes d'adaptation à la pression se fait sur les différents modèles hyper/thermophiles piézophiles. Leur manipulation est bien maîtrisée par des laboratoires de recherche spécialisés dans ce domaine.

10 La culture est l'observation de ces organismes en laboratoire, c'est-à-dire dans un environnement où la pression atmosphérique est bien en deçà de la pression propre au milieu d'origine, requiert des équipements spécifiques.

15 Des bioréacteurs anaérobies sont utilisés pour la culture des micro-organismes. Les microorganismes prélevés dans des fonds sous-marins peuvent être introduits sous pression dans le conteneur de ces bioréacteurs. Les micro-organismes sont ensuite extraits du bioréacteur à l'issue d'une phase de culture, aux fins d'être observés au moyen de dispositifs d'observation connus, tels que, par exemple un microscope électronique, un spectromètre ou encore des outils d'analyse biologique ou
20 de révélation d'éléments constitutants.

L'observation des micro-organismes après extraction implique toutefois aujourd'hui d'opérer à une pression environnante moindre que la pression du milieu d'origine ou encore de la pression à l'intérieur du
25 conteneur du bioréacteur utilisé pour la culture.

Cet abaissement de la pression est préjudiciable aux micro-organismes sans que l'on puisse déterminer précisément dans quelle mesure, le cas échéant.

30

Les solutions existantes présentent donc des inconvénients.

3. Résumé de l'invention.

5 L'invention permet d'améliorer l'état de l'art en proposant un
dispositif bioréacteur comprenant un conteneur principal adapté à une culture
de micro-organismes soumis à une première pression, le conteneur principal
comportant au moins une ouverture principale, ledit dispositif bioréacteur.
Le conteneur principal du bioréacteur comprend en outre une première
10 ouverture secondaire et une seconde ouverture secondaire, et le bioréacteur
comprend, entre la première ouverture secondaire et la seconde ouverture,
une circuiterie comprenant une cellule d'observation adaptée à la circulation
d'un contenu de microorganismes sous une lentille d'observation translucide,
à une seconde pression sensiblement identique à la première pression, et au
15 moins deux éléments d'isolement adaptés à une séparation mécanique de la
cellule d'observation de sorte que la cellule d'observation puisse être
détachée du bioréacteur tout en contenant une partie des micro-organismes
soumis à la seconde pression.

20 Selon un mode de réalisation de l'invention, le dispositif
bioréacteur comprend un dispositif mélangeur adapté au mélange et/ou
brassage des microorganismes.

Avantageusement, le dispositif bioréacteur est un bioréacteur
25 anaérobie.

Selon un mode de réalisation de l'invention, chacun des deux
éléments d'isolement comprend au moins une vanne ainsi qu'au moins un
dispositif mécanique de fixation d'éléments de la circuiterie comprenant la
30 cellule d'observation.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la cellule d'observation et la circuiterie du bioréacteur disposée entre les ouvertures secondaires sont adaptées à contenir un mélange de microorganisme sous une pression supérieure 1000 bars.

5

Selon un mode de réalisation de l'invention, la lentille de la cellule d'observation est constituée d'un verre traité pour supporter des pressions de plusieurs centaines de bars.

10

Avantageusement, la circuiterie est constituée d'un matériau inoxydable et/ou traité pour résister à une oxydation provenant des conditions intérieures au bioréacteur pendant la culture de micro-organismes prélevés dans des fonds marins et cultivés à une pression supérieure à plusieurs centaines de bars.

15

4. Liste des figures.

L'invention sera mieux comprise, et d'autres particularités et avantages apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, la description faisant référence aux dessins annexés parmi lesquels :

20

- La **figure 1** représente un bioréacteur anaérobie adapté à la culture de micro-organismes selon l'état de l'art.

25

- La **figure 2** représente un bioréacteur anaérobie adapté à la culture et à l'observation de micro-organismes selon un mode particulier et non limitatif de l'invention.

30

5. Description détaillée de modes de réalisation de l'invention.

Sur les **figures 1 à 2**, les modules représentés sont des unités fonctionnelles, qui correspondent ou non à des unités physiquement distinguables. Par exemple, ces modules ou certains d'entre eux sont regroupés dans un unique composant. *A contrario*, selon d'autres modes de réalisation, certains modules sont composés d'entités physiques séparées.

La **figure 1** représente un bioréacteur AB1 adapté à la culture de micro-organismes selon l'état de l'art. La culture de micro-organismes dans ce type de bioréacteur est réalisée entre des opérations d'insertion sous pression, par une ouverture principale MI1 d'un conteneur principal R,1 et une extraction ultérieure de tout ou partie des micro-organismes cultivés, par la même ouverture MI1, notamment à des fins d'observation et en utilisant un ou plusieurs types de microscopes (microscopes électroniques, par exemple). Un tel bioréacteur permet de cultiver les micro-organismes à une pression P1 de plusieurs dizaines de bars. Le mécanisme de verrouillage et de déverrouillage de l'ouverture MI1 est adapté à assurer une bonne étanchéité du conteneur R1 à ce niveau de pression. Le plus généralement, un tel bioréacteur comprend un dispositif de mixage et de brassage MIX1, mû par un moteur MOT1 associé. Les éventuelles parties mobiles traversant la cloison du conteneur R1 sont associées à des éléments garantissant le maintien de la pression P1 et la mobilité des pièces concernées (par exemple, des joints et/ou des paliers ou encore des coussinets sont utilisés autour d'un arbre tournant. Selon des variantes, d'autres types de systèmes de brassage peuvent comprendre des éléments adaptés à un couplage magnétique de pièces tournantes dont l'une ou plusieurs peuvent être extérieures au conteneur R1 et l'une ou plusieurs autres peuvent être intérieures au conteneur R1.

Des sondes PROB sont utilisées pour caractériser le milieu à l'intérieur du conteneur R1, notamment et par exemple, la pression et la température. Avantagusement, un jeu de sondes peut comprendre un capteur d'hygrométrie ou encore un ou plusieurs capteurs sensibles à la

présence et/ou à la concentration de gaz émis par la culture des micro-organismes. Les sondes PROB sont reliées à un dispositif extérieur de contrôle et de monitoring CTRL1. Un tel dispositif CTRL1 comprend usuellement un ou plusieurs indicateurs représentatifs de grandeurs mesurées par les sondes PROB, parfois regroupés dans un module de monitoring MON1 du dispositif CTRL1. Selon des variantes, une unité de monitoring telle que l'unité MON1 peut être interne ou externe au dispositif de contrôle CTRL1.

On entend ici, par le terme « monitoring », une mise à disposition d'informations utiles à la surveillance du milieu intérieur au conteneur R1, et notamment une pression et une température, ainsi que, par exemple, une présence et une concentration d'un ou plusieurs gaz susceptibles d'être générés par la culture des micro-organismes placés à l'intérieur du conteneur R1 du bioréacteur AB1.

15

La **figure 2** représente un bioréacteur adapté à la culture et à l'observation de micro-organismes selon un mode particulier et non limitatif de l'invention.

Le bioréacteur AB1 est architecturé de sorte qu'il comprend un conteneur principal R1 similaire à celui du bioréacteur de la figure 1 (bioréacteur selon l'état de l'art), également équipé d'une ouverture principale MI1 et d'un dispositif de mixage et de brassage MIX1, ainsi que de sondes PROB reliées à un ou plusieurs dispositifs de contrôle et/ou de monitoring CTRL1. Avantageusement, et selon un mode de réalisation particulier et non limitatif de l'invention, le bioréacteur AB1 comprend en outre une circuiterie CIR1 comprenant une cellule d'observation VC1, entre deux ouvertures secondaires SI1 et SI2 du conteneur principal R1. La circuiterie CIR1 comprend également au moins deux modules d'isolation (ou isolement) ISO1 et ISO2 opérant comme des vannes et respectivement disposés entre la première ouverture secondaire SI1 et la cellule d'observation VC1, d'une part, et la seconde ouverture secondaire SI2 et la cellule d'observation VC1, d'autre part. Avantageusement, les éléments

d'isolation / isolement (modules) ISO1 et ISO2 comprennent chacun, outre une vanne adaptée à garantir une étanchéité entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule d'observation VC1, des éléments de fixation et de verrouillage mécanique adaptés à permettre une séparation (et un couplage) mécanique de la cellule de culture et d'observation VC1 du reste (ou avec le reste) de la circuiterie CIR1. On entend ici par isolation (ou isolement) une capacité à séparer mécaniquement la cellule de culture et d'observation VC1 du reste de la circuiterie CIR1 tout en maintenant le niveau de pression intérieure à la cellule à une pression P2 sensiblement identique à la pression P1 présente dans le conteneur principale R1.

Avantageusement, une isolation pneumatique et mécanique (donc une étanchéité de la cellule VC1 ainsi qu'une séparation mécanique par désaccouplement) permet l'observation à travers une lentille d'observation translucide VCL du contenu de la cellule VC1 du contenu de la cellule soumis à une pression P2 sensiblement identique à la pression P1. Selon un mode de réalisation particulier et non limitatif de l'invention, des caractéristiques mécaniques de la cellule VC1 et de sa lentille VCL sont telles que l'observation des micro-organismes soumis à la pression P2 soit réalisable au moyen d'un microscope électronique. On entend ici par pression P2 sensiblement identique à la pression P1 une pression éventuellement légèrement inférieure ou supérieure à la pression P1, du fait de variations liées à des pertes de charge ou à des gradients de température ou de concentration de micro-organismes en fonction de leur localisation précise au sein du conteneur principal R1 ou de la circuiterie CIR1.

Avantageusement, et grâce à l'utilisation du bioréacteur AB1 selon un mode de réalisation de l'invention, il est possible d'observer des micro-organismes au cours d'une culture sous des pressions équivalentes à leur environnement d'origine et sans altération possible du fait de leur extraction du bioréacteur en vue d'une phase d'observation. En effet, les micro-organismes peuvent être injectés dans le bioréacteur AB1 en conservant la pression de leur environnement d'origine (fonds sous-marins, par exemple) par le biais de l'ouverture principale MI1 du conteneur R1.

Selon un mode de réalisation particulier et non limitatif de l'invention, les éléments ISO1 et ISO2 comprennent une ou plusieurs vannes d'étanchéités éventuellement assemblées en série et au moins un système de fixation par vis/écrou couplé à un ou plusieurs joints et susceptibles d'être manœuvrés manuellement ou au moyen d'un outil classique ou encore d'un outil spécifique. L'usage d'un outil spécifique permet de s'affranchir de manœuvre accidentelle dès lors que l'outil est maintenu disponible uniquement pour un ou plusieurs utilisateurs habilités à agir sur la circuiterie CIR1 du bioréacteur AB1 et notamment aux fins de séparer la cellule VC1 d'observation.

Ainsi et selon le mode de réalisation décrit, il est possible de détacher physiquement la cellule de culture et d'observation VC1 pour observer les micro-organismes contenus au moyen d'un microscope électronique et à travers la lentille translucide VCL.

La cellule VC1 est de fait un élément escamotable du bioréacteur AB1. Avantageusement, l'invention peut s'appliquer à différents types de bioréacteur et notamment un bioréacteur anaérobie.

En d'autres termes, le bioréacteur AB1 comprend un conteneur principal R1 adapté à une culture de micro-organismes soumis à la première pression P1. Son conteneur principal R1 comprend au moins une ouverture principale M11.

Le conteneur principal R1 comprend en outre au moins une première ouverture secondaire S11 et une seconde ouverture secondaire S12. De plus, le bioréacteur AB1 comprend, entre la première ouverture secondaire S11 et la seconde ouverture S12 :

- la circuiterie CIR comprenant la cellule d'observation VC1 adaptée à la circulation d'un contenu sous la lentille d'observation translucide (éventuellement transparente) VCL, à une seconde pression P2 sensiblement identique à la première pression P1,
- au moins les deux éléments d'isolement ISO1 et ISO2, lesquels sont adaptés à une séparation mécanique de la cellule

d'observation VC1 de sorte que cette cellule d'observation puisse être détachée du bioréacteur AB1 tout en contenant une partie des micro-organismes soumis à la seconde pression P2 (à l'intérieur de la cellule).

- 5 L'invention ne se limite pas au seul mode de réalisation décrit ci-avant mais à tout dispositif de culture de micro-organismes sous pression, à une pression pouvant dépasser plusieurs dizaines de bars, comprenant une cellule d'observation escamotable adaptée à être détachée et à permettre le maintien de la pression de culture lors d'une observation au moyen d'un
- 10 dispositif d'observation distant du dispositif de culture sans dégradation des micro-organismes contenus du fait de leur déplacement utile à une observation au moyen du dispositif d'observation.

REVENDEICATIONS

5

1. Dispositif bioréacteur (AB1) comprenant un conteneur principal (R1) adapté à une culture de micro-organismes soumis à une première pression P1, ledit conteneur principal (R1) comprenant au moins une ouverture principale (MI1), ledit dispositif bioréacteur (AB1) étant caractérisé en ce que :
10 ledit conteneur principal (R1) comprend en outre:
 - une première ouverture secondaire (SI1),
 - une seconde ouverture secondaire (SI2), et en ce que
- 15 ledit bioréacteur (AB1) comprend, entre ladite première ouverture secondaire (SI1) et ladite seconde ouverture (SI2),
 - une circuiterie (CIR1) comprenant une cellule d'observation (VC1) adaptée à la circulation d'un contenu de micro-organismes sous une lentille d'observation transparente, à une seconde pression (P2)
 - 20 sensiblement identique à ladite première pression (P1),
 - au moins deux éléments d'isolement (ISO1, ISO2) adaptés à une séparation mécanique de ladite cellule d'observation (VC1) de sorte que ladite cellule d'observation (VC1) puisse être détachée dudit bioréacteur (AB1) tout en contenant une partie desdits micro-
 - 25 organismes soumis à ladite seconde pression (P2).
2. Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif mélangeur (MIX1).
3. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé
30 en ce que ledit bioréacteur (AB1) est un bioréacteur anaérobie.

4. Dispositif selon l'une quelconques des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que chacun desdits deux éléments d'isolement (ISO1, ISO2) comprend au moins une vanne (V1, V2) ainsi qu'au moins un dispositif mécanique (M1, M2) de fixation d'éléments de ladite circuiterie (CIR1).
- 5 5. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite circuiterie (CIR 1) est adaptée à contenir une mélange sous une pression (P2) supérieure 1000 bars.
6. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite lentille est constituée d'un matériau d'un verre traité pour résister à des pressions de plusieurs centaines de bars.
- 10 7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ladite circuiterie (CIR1) est constituée d'un matériau inoxydable.

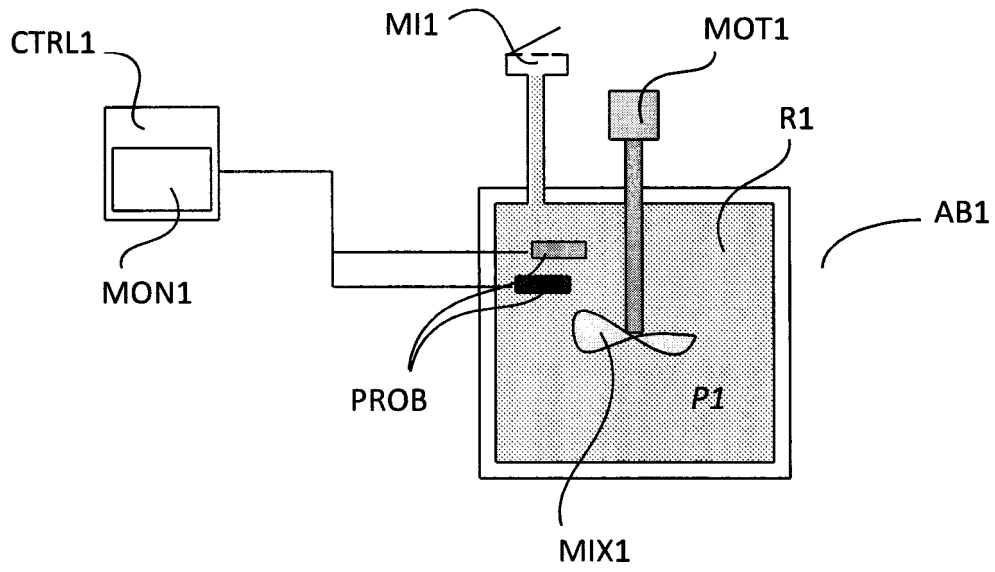


Fig. 1

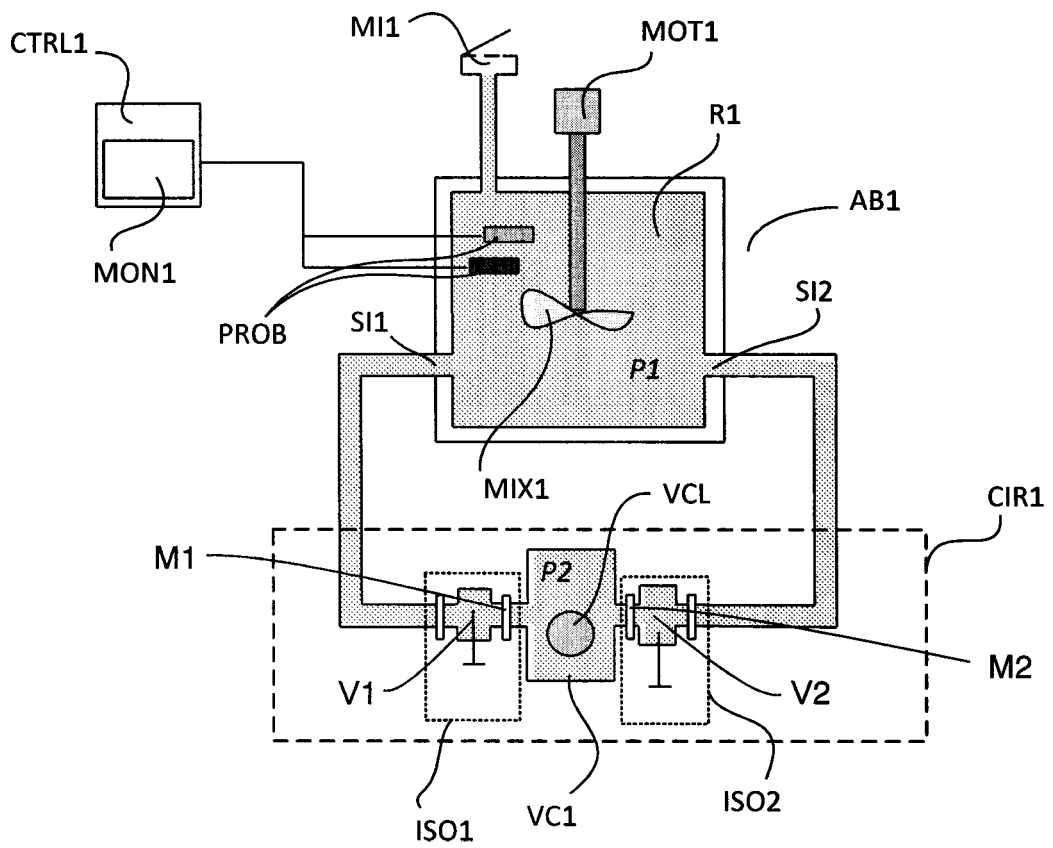


Fig. 2

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

NEANT

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

DATABASE WPI Week 201018 Thomson Scientific, London, GB; AN 2010-B03250 XP002739295, & CN 101 624 567 A (UNIV ZHEJIANG) 13 janvier 2010 (2010-01-13)

DATABASE WPI Week 201045 Thomson Scientific, London, GB; AN 2010-H27766 XP002739296, & CN 201 495 225 U (UNIV ZHEJIANG) 2 juin 2010 (2010-06-02)

WO 02/071050 A1 (ABB AB [SE]; KORNFELDT ANNA [SE]; LILJENBERG THOMAS [SE]; BACKA STEFAN) 12 septembre 2002 (2002-09-12)

Craig D Taylor ET AL: "Subsampling Technique for Measuring Growth of Bacterial Cultures Under High Hydrostatic Pressure¹", American Society for Microbiology, 1 janvier 1976 (1976-01-01), pages 355-359, XP055187647, Extrait de l'Internet: URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC170070/pdf/aem00008-0059.pdf> [extrait le 2015-05-06]

WO 2007/117987 A2 (FLUXION BIOSCIENCES INC [US]; IONESCU-ZANETTI CRISTIAN [US]; KHINE MIC) 18 octobre 2007 (2007-10-18)

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT