

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

①1 N° de publication : **3 131 636**

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

②1 N° d'enregistrement national : **21 14688**

⑤1 Int Cl⁸ : **G 01 N 33/48 (2022.01), C 12 Q 1/04, G 01 N 27/403**

①2

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 PROCÉDÉ ET SYSTÈME POUR DÉTECTER ET ÉVENTUELLEMENT IDENTIFIER UN MICRO-ORGANISME CONTENU DANS UN ÉCHANTILLON.

②2 Date de dépôt : 30.12.21.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 07.07.23 Bulletin 23/27.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 03.01.25 Bulletin 25/01.

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) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE
ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES
Etablissement Public — FR.

⑦2 Inventeur(s) : BABIN Thibaut, GOUGIS Maxime,
MAILLEY Pascal et MARCOUX Pierre.

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

⑦4 Mandataire(s) : BREVALEX.

FR 3 131 636 - B1



Description

Titre de l'invention : PROCÉDÉ ET SYSTÈME POUR DÉTECTER ET ÉVENTUELLEMENT IDENTIFIER UN MICRO-ORGANISME CONTENU DANS UN ÉCHANTILLON

Domaine technique

- [0001] La présente invention appartient au domaine technique de la microbiologie diagnostique et plus particulièrement au domaine de la détection et de l'identification de micro-organismes présents dans un échantillon liquide ou solide.
- [0002] L'avancée principale de la présente invention réside dans l'utilisation de l'électrochimie non seulement pour la détection d'un micro-organisme tel qu'un pathogène mais aussi et en parallèle pour son identification. Les applications de la présente invention concernent notamment les tests de stérilité dans le milieu de la santé mais également dans d'autres milieux comme le milieu pharmaceutique, biomédical, environnemental ou agroalimentaire.

Etat de la technique antérieure

- [0003] En microbiologie clinique, et plus particulièrement dans le domaine de l'hémoculture, l'opérateur/trice prélève environ 10 mL de sang sur un patient. Cette prise d'essai est placée dans un flacon contenant entre 30 et 40 mL d'un milieu de culture propice à la croissance bactérienne. Le principe de la détection repose sur la respiration bactérienne, en se multipliant les bactéries produiront une quantité de dioxyde de carbone détectable.
- [0004] Par exemple, le fond du flacon peut être composé d'un polymère, qui changera de couleur ou de fluorescence en fonction de la concentration en CO₂ du liquide. Les automates d'hémoculture permettent alors l'agitation des flacons à 37°C tout en utilisant une méthode optique afin de vérifier la variation de couleur ou de fluorescence du polymère.
- [0005] Une fois le flacon décelé comme positif, l'opérateur/trice doit prélever une petite quantité du bouillon de culture afin d'effectuer une coloration de Gram. Cette manipulation n'est pas automatisée et nécessite des produits dangereux tels que, par exemple, cristal violet ou violet de gentiane, solution de Lugol (iode), alcool, acétone ou fuchsine. Après cette première orientation, l'identification est affinée avec l'utilisation d'un spectrophotomètre de masse MALDI-TOF (pour « Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight ») puis un antibiogramme.
- [0006] Il ressort de ce procédé à plusieurs étapes longues que le temps entre la prise d'essai et le résultat est, au mieux, de plusieurs dizaines d'heures. Ce délai important ne pouvant être associé à une absence de traitement, une antibiothérapie à spectre large

est débutée sans attendre le résultat de l'hémoculture. Or, des antibiotiques peu ou pas adaptés au pathogène peuvent entraîner une antibiorésistance, un des plus grands dangers pour la santé mondiale.

- [0007] Les automates d'hémoculture ou CMBCS pour « Continuous Monitoring Blood Culture System » sont aujourd'hui tous des systèmes qui se cantonnent au test de stérilité uniquement : ils détectent la présence d'un micro-organisme, même s'il s'agit d'une cellule unique, sans donner le moindre renseignement quant à sa nature comme eucaryote ou procaryote, Gram+ ou Gram-, ou encore espèce.
- [0008] On peut citer les systèmes de respirométrie radiométrique (Bactec™ 460, BD), de détection du CO₂ en infrarouge (Bactec™ 660/730/860, BD), de détection du CO₂ en fluorescence (Bactec™ 9240, BD), de détection du CO₂ en colorimétrie (BacT/ALERT® , bioMérieux) ou de détection manométrique (VersaTREK™ , ThermoScientific et SIGNAL™ , ThermoScientific).
- [0009] Peu d'automates d'hémoculture ont proposé à la fois la détection et l'identification, ou tout au moins, une orientation. On peut citer :
- en phase gaz : l'emploi d'un CSA (pour « Colorimetric Sensor Array »), nez artificiel à transduction colorimétrique, inséré dans le bouchon du flacon [1];
 - en phase liquide : l'emploi de réseaux d'anticorps sur un prisme de SPR au contact de l'hémoculture [2].
- [0010] En électrochimie, il est courant d'utiliser des électrodes sensibles au pH. Plusieurs matériaux sont connus pour leur variation de potentiel caractéristique dans une gamme donnée de pH, parmi eux, des polymères conducteurs comme la polyaniline et des oxydes métalliques comme l'oxyde d'iridium.
- [0011] La demande internationale WO 2021/032654 A1 [3] propose un dispositif du type automate autonome permettant de détecter la présence de micro-organismes dans un échantillon en suivant, par électrochimie, les variations de pH.
- [0012] La majorité des équipes de recherche travaillant sur ces technologies utilisent l'électrochimie pour la détection *a priori* d'un pathogène. Grâce à l'utilisation d'une sonde immobilisée sur une électrode et en choisissant la méthode de mesure adaptée, il est en effet possible de détecter le couplage entre sonde et micro-organisme.
- [0013] La sonde dépend du pathogène, du milieu et de la technique utilisée. Il est possible de greffer un anticorps, un bactériophage, une sonde thiol, un aptamère, une sonde ADN, une sonde ARN ou une sonde spécifique à une protéine afin de détecter un mécanisme biologique propre à la bactérie recherchée.
- [0014] Les principales techniques utilisées sont l'ampérométrie consistant en la détection d'une variation de courant et la spectroscopie d'impédance consistant en la détection d'une modification de la résistance de l'électrode.

[0015] Le frein majeur à l'utilisation de ces technologies dans le domaine de la microbiologie diagnostique pour l'étape de détection est leur détection *a priori*, inenvisageable en terme clinique. De plus, bien que ces types d'électrodes permettent de discriminer les pathogènes entre celui recherché et d'autres microbes « parasites », il n'est pas possible d'identifier un pathogène autre que celui recherché.

[0016] Les inventeurs se sont fixé pour but de proposer un procédé répondant aux problèmes techniques des procédés de l'art antérieur i.e. un procédé facile à mettre en œuvre, rapide, efficace, permettant non seulement de détecter mais aussi d'identifier un micro-organisme contenu dans un échantillon liquide ou solide.

Présentation de l'invention

[0017] La présente invention permet d'atteindre le but que se sont fixé les inventeurs. En effet, ces derniers ont montré qu'il est possible de proposer un procédé facile à mettre en œuvre, rapide, efficace, grâce auquel il est possible de détecter mais aussi d'identifier un micro-organisme contenu dans un échantillon liquide ou solide et ce, en utilisant l'électrochimie.

[0018] En particulier, l'invention repose sur une variation de signal électrochimique et notamment sur l'évolution de la dérivée du potentiel électrochimique par rapport au temps d'au moins une et typiquement de plusieurs électrodes de matériaux différents. Avec un traitement du signal adapté, il est possible de détecter la croissance d'un micro-organisme comme une croissance bactérienne et d'orienter l'identification. Cela permet donc une réduction du temps avant résultat, une diminution du temps de travail et des risques pour l'opérateur/trice.

[0019] Le procédé objet de l'invention peut être mis en œuvre sur le flacon instrumenté tel que décrit dans la demande internationale WO 2021/032654 A1 [3] dans lequel sont placées des électrodes composées de différents matériaux permettant une détection plus rapide pour deux raisons :

- 1) le flacon est déjà instrumenté et ne nécessite pas d'automate encombrant, le temps de transport requis habituellement n'est plus nécessaire et
- 2) la mesure est effectuée directement dans le flacon et non pas par l'intermédiaire d'un polymère sensible au dioxyde de carbone.

[0020] Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé pour détecter et éventuellement identifier un micro-organisme contenu dans un échantillon comprenant les étapes consistant à

- a) placer l'échantillon, dans un milieu de culture liquide, en présence d'une électrode de mesure et d'une électrode de référence et dans des conditions adaptées à la croissance des micro-organismes,

b) mesurer, au cours du temps, la différence de potentiel entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence,

c) calculer la dérivée de la différence de potentiel à partir de la mesure effectuée à l'étape b) moyennant quoi le profil de la dérivée du potentiel est obtenu, et

d) détecter et éventuellement identifier un micro-organisme contenu dans ledit échantillon à partir du profil obtenu à l'étape c).

[0021] L'échantillon mis en œuvre dans le cadre du procédé de l'invention peut être tout échantillon habituellement stérile mais susceptible de contenir des micro-organismes suite à un événement particulier comme une contamination, une infection, une pathologie ou un dysfonctionnement d'un système de filtration, de décontamination ou de nettoyage. Cet échantillon peut se présenter sous forme liquide ou solide.

[0022] L'échantillon mis en œuvre dans le procédé selon l'invention est avantageusement choisi dans le groupe constitué par un fluide biologique ; de l'eau comme, par exemple, de l'eau filtrée de grade stérile notamment utilisée dans les installations et la production médicale, de l'eau souterraine, de l'eau de source ou de l'eau de surface ; un prélèvement à partir d'un effluent industriel liquide ; un prélèvement provenant d'une filtration d'air ; un prélèvement dans un produit alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique et un prélèvement sur un objet.

[0023] Dans un mode de réalisation particulier, le fluide biologique est avantageusement choisi dans le groupe constitué par le sang tel que du sang entier ou du sang entier anti-coagulé, le sérum sanguin, le plasma sanguin, la lymphe, les larmes, le sperme, l'urine, le lait, le liquide céphalo-rachidien, le liquide interstitiel, un liquide articulaire, un liquide péricardique, un fluide isolé de moelle osseuse, un extrait cellulaire, un extrait tissulaire, un extrait d'organes et un de leurs mélanges. Ainsi, le fluide biologique peut être tout fluide naturellement sécrété ou excrété d'un corps humain ou animal ou tout fluide récupéré, à partir d'un corps humain ou animal, par toute technique connue de l'homme du métier telle qu'une extraction, un prélèvement, une ponction ou un lavage. Les étapes de récupération et d'isolement de ces différents fluides à partir du corps humain ou animal sont réalisées préalablement à la mise en œuvre du procédé selon l'invention.

[0024] Dans un mode de réalisation particulier, l'effluent industriel liquide dans lequel le prélèvement est effectué peut être un effluent d'une industrie agro-alimentaire, pharmaceutique ou cosmétique.

[0025] Dans un mode de réalisation particulier, l'objet sur lequel le prélèvement est effectué peut être choisi parmi des installations de grande taille comme un objet industriel comme un appareil électronique ou une machine utilisée dans les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques, une cuve, une cuisine de restaurant,

une chambre froide, un sanitaire, un conteneur, et des objets de petite taille comme des dispositifs médicaux ou des tuyaux.

[0026] Dans le cadre de la présente invention, on entend par « prélèvement » tout type de collecte d'échantillons, par exemple, par contact, raclage, écouvillonnage, forage, découpage, poinçonnage, broyage, lavage, rinçage, aspiration, ponction ou pompage.

[0027] Dans un mode de réalisation plus particulier, l'échantillon mis en œuvre dans le procédé selon l'invention est du sang comme du sang humain ou animal. Ce dernier est normalement stérile mais peut contenir des micro-organismes comme des bactéries lors de bactériémie non pathologique ou pathologique. En effet, des bactéries peuvent être présentes dans le sang suite à des actes théoriquement inoffensifs tels que le brossage de dents, des soins dentaires ou des actes médicaux impliquant des sondes ou des cathéters. On parle alors de bactériémie non pathologique. La bactériémie pathologique correspond, quant à elle, à la présence de bactéries dans le sang suite à une pneumonie, une plaie ou une infection urinaire.

[0028] Parmi les micro-organismes contenus ou susceptibles d'être contenus dans l'échantillon, on trouve aussi bien des micro-organismes procaryotes tels que les archées ou les bactéries Gram+ ou Gram-, que des micro-organismes eucaryotes comme les levures et autres champignons microscopiques et les protistes comme les algues ou protozoaires.

[0029] A titre d'exemples illustratifs et non limitatifs de micro-organismes contenus ou susceptibles d'être contenus dans l'échantillon mis en œuvre dans le cadre de l'invention, on peut citer les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*, les bactéries de la famille des *Pseudomonadaceae*, les bactéries du genre *Staphylococcus*, les bactéries du genre *Streptococcus*, les bactéries du genre *Campylobacter*, les bactéries du genre *Haemophilus*, les bactéries du genre *Anaerococcus*, les bactéries du genre *Bactéroïdes*, les bactéries du genre *Acinetobacter*, les bactéries du genre *Stenotrophomonas*, les bactéries du genre *Chromobacter*, les bactéries du genre *Fusobacterium*, les bactéries du genre *Pasteurella*, les bactéries du genre *Bacillus*, les bactéries du genre *Listeria*, les bactéries du genre *Clostridium*, les bactéries du genre *Mycobacteria*, les bactéries du genre *Enterococcus* et les bactéries du genre *Pasteurella*, les levures du genre *Candida*, les levures du genre *Saccharomyces*, les champignons du genre *Aspergillus*, les champignons du genre *Penicillium* et/ou les archées du genre *Methanobrevibacter*.

[0030] De plus, parmi les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* contenues ou susceptibles d'être contenues dans l'échantillon mis en œuvre dans le cadre de l'invention, on peut citer les bactéries des genres *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Yersinia*, *Citrobacter* et *Providencia*.

- [0031] Préalablement à la mise en contact avec le milieu de culture liquide en présence des électrodes i.e. préalablement à l'étape a) du procédé selon l'invention, l'échantillon peut être soumis à une étape de préparation au moyen de tout processus de préparation d'un échantillon susceptible de contenir des micro-organismes, connu par l'homme du métier. Cette étape peut notamment consister, de manière non exhaustive, en une dilution, une concentration, une division en portions équivalentes ou non ou une mise en suspension.
- [0032] Typiquement, lors de l'étape a) du procédé selon l'invention, l'échantillon est dilué dans le milieu de culture liquide, lorsque cet échantillon est liquide. En variante, lorsqu'il est solide, il est mis en suspension dans le milieu de culture liquide.
- [0033] Le milieu de culture liquide mis en œuvre lors de l'étape a) du procédé selon l'invention peut être tout milieu liquide adapté pour la culture des micro-organismes, connu de l'homme du métier. Par « adapté pour la culture des micro-organismes », on entend une préparation au sein de laquelle les micro-organismes peuvent se multiplier. Ce milieu comprend une source de carbone, comme du glucose, de l'acétate ou du glycérol ; une source d'azote, comme de l'ammonium, des nitrates ou des acides aminés ; et des sels et/ou des oligo-éléments et des vitamines pour la croissance de micro-organismes. En particulier, ce milieu de culture liquide peut ne pas être sélectif pour un type particulier de micro-organismes. En variante, il peut être sélectif d'un type particulier de micro-organismes.
- [0034] A titre d'exemples de milieux de culture liquides utilisables lors de l'étape a) du procédé selon l'invention, on peut citer le milieu de culture NB1 (« Nutrient Broth No. 1 »), le milieu de culture NB2 (« Nutrient Broth No. 2 »), le milieu de culture Mueller Hinton, le milieu de culture LB (« Lysogen Broth », également connu sous le nom de « Luria Bertani »), le milieu de culture TSB (« Tryptic Soybean Broth»), le milieu de culture BHI (« Brain Heart Infusion ») et le milieu de culture BACT/ALERT®. Ces milieux de culture sont notamment disponibles auprès des sociétés ThermoFisher, Bio-Rad Laboratories, bioMérieux et Sigma Aldrich.
- [0035] Lors de l'étape a) du procédé selon l'invention, des conditions adaptées à la croissance des micro-organismes sont mises en œuvre. En d'autres termes, au cours de l'étape a) du procédé selon la présente invention, les micro-organismes sont maintenus dans un environnement qui leur permet d'augmenter en nombre par division cellulaire. Cet environnement comprend non seulement le milieu de culture dans lequel l'échantillon a été dilué ou remis en suspension, mais aussi d'autres conditions telles qu'une température et une atmosphère qui permettent la croissance cellulaire.
- [0036] Typiquement, la température mise en œuvre lors de l'étape a) se situe entre 20°C et 40°C. Des exemples particuliers de température mise en œuvre à l'étape a) sont 20°C, 25°C, 30°C, 32°C, 37°C et 39°C.

- [0037] En ce qui concerne les conditions atmosphériques, l'étape a) peut être effectuée sous une atmosphère sans oxygène, sous l'air, dans l'air + 5% de CO₂ ou sous un mélange gazeux composé de 5% d'O₂, 5% de CO₂ et 90% de N₂. Une atmosphère sans oxygène i.e. une atmosphère anoxique est à privilégier lorsque le ou les micro-organismes contenus ou susceptibles d'être contenus dans l'échantillon se développent dans des conditions anaérobies strictes. Avantageusement, comme précédemment expliqué, le procédé selon l'invention est réalisé dans un flacon instrumenté tel que décrit dans la demande internationale WO 2021/032654 A1 [3], les conditions atmosphériques correspondent donc à l'air contenu dans le flacon suite à sa fermeture hermétique par un bouchon.
- [0038] Lors de l'étape a) du procédé selon l'invention, le milieu de culture comprenant l'échantillon susceptible de contenir ou contenant des micro-organismes est en contact avec au moins deux électrodes. Ces électrodes correspondent à au moins une électrode de mesure, également désignée par l'expression « électrode de travail » et une électrode de référence.
- [0039] Dans un mode de réalisation particulier, au moins deux, au moins trois, au moins quatre, au moins cinq, au moins six, au moins sept, au moins huit, au moins neuf, au moins dix électrodes de mesure, identiques ou différentes, peuvent être mises en œuvre. La partie expérimentale ci-après présente un mode de réalisation plus particulier avec quatre paires différentes d'électrodes de mesure et une électrode de référence.
- [0040] Par « électrode de mesure différentes », on entend des électrodes dont la nature chimique diffère. Toute électrode de mesure connue de l'homme du métier est utilisable dans le cadre de la présente invention.
- [0041] Ainsi, l'électrode de mesure utilisée dans le procédé selon l'invention peut être une électrode massive en métal, une électrode de verre, une électrode en carbone vitreux, une électrode réalisée sous forme d'un dépôt d'une encre conductrice ou une électrode réalisée sous forme d'un électrodépôt d'un élément conducteur.
- [0042] Toute encre conductrice connue de l'homme du métier peut être mise en œuvre dans le cadre de l'invention. Dans un mode de réalisation particulier, l'encre conductrice utilisée est une encre à base d'ions métalliques ou de polymères organiques conducteurs tels que le polythiophène (PT), la polyaniline (PANI) éventuellement dopée avec de l'acide dodecylbenzènesulfonique (DBSA), le poly(3,4-éthylènedioxythiophène) couplé au poly(styrène sulfonate) de sodium (PEDOT:PSS), le polypyrrole ou le polyphthalocyanine. Dans un autre mode de réalisation particulier, l'encre conductrice utilisée dans le cadre de l'invention est une encre carbone comprenant éventuellement un élément conducteur additionnel.

- [0043] Par « élément conducteur », on entend un élément choisi dans le groupe constitué par les polymères organiques conducteurs tels que ceux listés ci-dessus, et les composés à base de métal comme, par exemple, un oxyde métallique tel que l'oxyde d'iridium (IrOx), un pigment à base de métal tel que le bleu de Prusse (Fe(III) ferrocyanure) ou encore un catalyseur organique ou organo-inorganique tel que de la phtalocyanine de cobalt.
- [0044] Toute électrode de référence classiquement utilisée en électrochimie peut être mise en œuvre dans le cadre de l'invention. Avantageusement, l'électrode de référence utilisée dans le cadre de l'invention est réalisée sous forme d'un dépôt d'une encre Ag/AgCl recouverte d'une couche de polymère comme une couche de polyuréthane, pour éviter la diffusion de particules d'argent et une inhibition de la croissance des micro-organismes.
- [0045] Il est également possible de mettre une contre-électrode en contact avec le milieu de culture liquide durant le procédé selon l'invention. La présence d'une contre-électrode n'est nullement obligatoire.
- [0046] Tout ce qui a été décrit dans la demande internationale WO 2021/032654 A1 [3] quant aux électrodes de mesure et de référence s'applique également à la présente invention comme, par exemple, l'organisation en deux parties des électrodes et les contacts électriques mis en œuvre.
- [0047] Avantageusement, le milieu de culture liquide et les électrodes sont stériles ou ont été stérilisés avant tout contact avec l'échantillon i.e. préalablement à l'étape a) du procédé. Le milieu de culture peut être stérilisé via différentes techniques connues dans l'état de la technique telles que, mais sans s'y limiter, l'utilisation de techniques aseptiques pour autoclaver et/ou préparer le milieu de culture. La technique d'autoclavage peut notamment être choisie pour stériliser les électrodes éventuellement en présence du milieu de culture liquide destiné à recevoir l'échantillon.
- [0048] L'étape b) du procédé selon l'invention correspond au suivi de l'évolution, dans le milieu de culture liquide, de la différence de potentiel entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence.
- [0049] Dans un mode de réalisation particulier, cette mesure de la différence de potentiel se fait de façon continue. En effet, il est possible en utilisant un potentiostat multivoie, de mesurer la différence de potentiel entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence de façon continue (modulo la période d'échantillonnage du potentiostat –e.g. quelques ms).
- [0050] Dans un autre mode de réalisation particulier, cette mesure de la différence de potentiel se fait de façon discontinue.
- [0051] Pour ce faire, la différence de potentiel est mesurée à une pluralité d'instantanés temporels distincts. En d'autres termes, l'étape b) consiste à mesurer la différence

de potentiel entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence à une pluralité d'instant temporels moyennant quoi des points de mesure de potentiel sont obtenus.

- [0052] Par « pluralité d'instant temporels distincts », on entend plus de 2, notamment plus de 5, en particulier, plus de 10 et, plus particulièrement, plus de 20 instant temporels distincts. Ces différents instant temporels peuvent être choisis à intervalles réguliers ou à intervalles irréguliers. Dans une forme de mise en œuvre particulière, les mesures sont effectuées à intervalles réguliers. L'homme du métier saura déterminer, sans effort inventif, l'intervalle de temps le plus adéquat en fonction de l'échantillon à étudier et des micro-organismes susceptibles d'être présents dans ce dernier. A titre d'exemple particulier, cet intervalle peut être compris entre 1 min et 30 min, notamment entre 2 min et 15 min et, en particulier, de l'ordre de 5 min ($5 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$). Dans une autre forme de mise en œuvre particulière, les mesures sont effectuées à intervalles irréguliers. En effet, on peut envisager de faire une prise de mesure asservie à la dérive temporelle du signal permettant ainsi de mesurer plus de points dans les zones de forte variation versus les périodes de stagnation du potentiel.
- [0053] Dans un mode de réalisation particulier et que la mesure soit continue ou discontinue, il est possible de réaliser la première mesure de la différence de potentiel à l'instant temporel t_1 juste après l'étape a) du procédé de l'invention i.e. 1 min, 2 min, 3 min, 4 min ou encore 5 min après la mise en contact de l'échantillon dans le milieu de culture liquide en présence des électrodes.
- [0054] Dans un autre mode de réalisation particulier et que la mesure soit continue ou discontinue, il est possible de réaliser la première mesure de potentiel à l'instant temporel t_1 au moins 1 après la mise en contact de l'échantillon dans le milieu de culture liquide en présence des électrodes.
- [0055] L'intervalle entre l'instant temporel t_1 de la première mesure et l'instant temporel t_d de la dernière mesure de potentiel lors de l'étape b) est variable et fonction notamment de l'échantillon à étudier, des micro-organismes susceptibles d'être présents dans ce dernier et de l'instant temporel t_1 . Avantagement, l'instant temporel t_d de la dernière mesure de potentiel est réalisé au moins 14 h, au moins 16 h, au moins 18 h, au moins 20 h ou encore au moins 22 h après l'étape a).
- [0056] Avantagement, les conditions opératoires lors de l'étape b) en terme de température et conditions atmosphériques sont identiques à celles mises en œuvre lors de l'étape a) du procédé selon l'invention telles que précédemment décrites.
- [0057] Par ailleurs, le milieu de culture peut être soumis à une agitation durant les étapes a) et/ou b) du procédé selon l'invention. Cette agitation durant l'étape a) permet un mélange homogène de l'échantillon avec le milieu de culture. Durant l'étape b) et notamment en présence de micro-organismes, cette agitation favorise une composition

uniforme du milieu de culture et empêche un éventuel dépôt de micro-organismes sur les électrodes. Toute technique connue pour agiter un milieu et n'interférant pas avec la mesure du potentiel est utilisable dans le cadre de la présente invention. Cette agitation est notamment telle qu'envisagée dans la demande internationale WO 2021/032654 A1 [3].

- [0058] L'étape c) consiste à calculer, de façon continue (cas d'une mesure de la différence de potentiel continue lors de l'étape b)) ou à partir des différentes mesures de potentiel obtenues à l'étape b) (cas d'une mesure de la différence de potentiel discontinue lors de l'étape b)), la dérivée du potentiel.
- [0059] En effet, afin d'observer plus nettement le début des variations de potentiel lorsque des micro-organismes provenant de l'échantillon se développent dans le milieu de culture, la dérivée de la différence de potentiel pour chaque électrode est utilisée. Ainsi, on observe la vitesse de modification du potentiel, beaucoup plus parlante et lisible que les courbes potentiométriques brutes.
- [0060] Dans un mode de réalisation particulier et lorsque la mesure de la différence de potentiel lors de l'étape b) est discontinue, le calcul de la dérivée de la différence de potentiel peut se faire de manière glissante sur un nombre pré-déterminé de points de mesure obtenus à l'étape b). En d'autres termes, on calcule la dérivée de la différence de potentiel lissée sur un nombre pré-déterminé de points de mesure de différence de potentiel (moyenne glissante sur un nombre pré-déterminé de points de mesure de différence de potentiel).
- [0061] Typiquement, le nombre pré-déterminé de points de mesure est égal à 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15. Avantageusement, le nombre pré-déterminé de points de mesure est égal à 5 et ce, notamment lorsque l'intervalle entre deux points de mesure de potentiel consécutifs est de l'ordre de 5 min.
- [0062] Par « de manière glissante », on entend que le calcul de la dérivée est réalisée pour un nombre pré-déterminé n de points de mesure de potentiel en calculant la première valeur de la dérivée correspond à la moyenne des dérivées des points de mesure de potentiel de p_1 à p_n , la deuxième valeur de la dérivée correspond à la moyenne des dérivées des points de mesure de potentiel de p_2 à p_{n+1} , la troisième valeur de la dérivée correspond à la moyenne des dérivées des points de mesure de potentiel de p_3 à p_{n+2} , et ainsi de suite...
- [0063] L'étape c) du procédé selon l'invention peut être réalisée une fois l'étape b) réalisée, i.e. pour une mesure discontinue, une fois l'ensemble des points de mesure de potentiel. En variante, l'étape c) du procédé selon l'invention peut être réalisée en même temps que l'étape b) du procédé et, pour une mesure discontinue, une fois le premier nombre pré-déterminé de points de mesure de potentiel obtenus. Le calcul réalisé à l'étape c) génère une réponse à n dimensions correspondant au profil de la

dérivée de la différence de potentiel. A partir de cette réponse à n dimensions, il est possible d'extraire un profil normalisé en utilisant des méthodes telles que PCA (pour « PluriComponent Analysis » ou analyse en composantes principales), MDS (pour « MultiDimensional Scaling » i.e. positionnement multidimensionnel) et réseaux neuronaux ou transformée de Fourier pour obtenir une dimensionnalité réduite. En d'autres termes, le procédé selon l'invention comprend une étape supplémentaire consistant à obtenir un profil normalisé de la dérivée du potentiel à partir du profil de la dérivée obtenu à l'étape c).

- [0064] La détection de la présence ou non de micro-organismes dans l'échantillon peut se faire en comparant le profil de la dérivée du potentiel ou éventuellement le profil normalisé de la dérivée de la différence de potentiel avec le profil de la dérivée du potentiel ou éventuellement le profil normalisé de la dérivée de la différence de potentiel obtenu avec un contrôle négatif i.e. dénué de micro-organismes et dans les mêmes conditions opératoires et notamment même(s) électrode(s) de travail et de référence et même milieu de culture.
- [0065] L'identification d'un micro-organisme particulier peut se faire en comparant le profil de la dérivée de la différence de potentiel ou éventuellement le profil normalisé de la dérivée du potentiel avec différents profils de la dérivée du potentiel ou éventuellement différents profils normalisés de la dérivée de la différence de potentiel obtenu, chacun, avec un micro-organisme connu et dans les mêmes conditions opératoires et notamment même(s) électrode(s) de travail et de référence et même milieu de culture.
- [0066] La présente invention concerne également un système pour détecter et éventuellement identifier un micro-organisme contenu dans un échantillon susceptible d'être mis en œuvre durant le procédé tel que précédemment défini comprenant
- i) un dispositif configuré pour la culture cellulaire en milieu liquide comprenant une électrode de mesure et une électrode de référence,
 - ii) une unité de mesure de la différence de potentiel entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence et configurée pour mesurer la différence de potentiel, en continue et/ou à une pluralité d'instantanés temporels,
 - iii) une unité électronique d'acquisition de la mesure de la différence de potentiel, reliée à l'unité de mesure du potentiel,
 - iv) une unité d'alimentation électrique pour alimenter l'unité électronique d'acquisition, et
 - v) une unité de traitement reliée à l'unité électronique d'acquisition et configurée pour traiter la mesure de la différence de potentiel et calculer, à partir de cette dernière, la dérivée de la différence de potentiel et comportant un module de détection et éventuellement d'identification d'un micro-organisme par analyse de la dérivée de la différence de potentiel.

- [0067] Dans un mode de réalisation particulier, l'unité de traitement est configurée pour traiter les points de mesure de la différence de potentiel et calculer, à partir de ces derniers, la dérivée de la différence de potentiel et/ou configurée pour traiter la mesure continue de la différence de potentiel et calculer, à partir de cette dernière, la dérivée de la différence de potentiel.
- [0068] D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront encore à l'homme du métier à la lecture des exemples ci-dessous donnés à titre illustratif et non limitatif, en référence aux figures annexées.

Brève description des figures

- [0069] [Fig.1] présente les courbes potentiométriques obtenues dans du sang humain après inoculation, à $t=0$, de 38 cfu (pour « colony-forming units » ou unités formant des colonies) de *Escherichia coli* - ATCC 8739 (PANI = polyaniline / IrOx = oxyde d'iridium / P2 = encre SunChemical Gwent C2070424P2 / BQ = encre Dupont BQ242).
- [0070] [Fig.2] présente les courbes potentiométriques obtenues dans du sang humain en absence de tout micro-organisme (PANI = polyaniline / IrOx = oxyde d'iridium / P2 = encre SunChemical Gwent C2070424P2 / BQ = encre Dupont BQ242).
- [0071] [Fig.3] présente les dérivées lissées du potentiel de l'électrode à base de polyaniline, obtenues dans du sang humain après croissance de différentes bactéries et pour un contrôle négatif.
- [0072] [Fig.4] présente les dérivées lissées du potentiel de l'électrode à base de polyaniline, obtenues dans du sang humain après croissance de toutes les bactéries testées, temps normalisé pour centrer les maximums.
- [0073] [Fig.5] présente l'espace 3D permettant l'orientation de l'identification de la bactériémie.
- [0074] [Fig.6] présente l'espace 2D permettant l'orientation de l'identification de la bactériémie.
- [0075] [Fig.7] présente le module en fonction de la fréquence, calculé à partir de la transformée de Fourier de la dérivée lissée du potentiel de l'électrode à base de polyaniline, obtenues dans du sang humain après croissance de toutes les bactéries testées.
- [0076] [Fig.8] présente le taux de typage Gram correct (%) par rapport au temps d'incubation supplémentaire après la positivité de la culture.

Description des modes de réalisation

I. Fabrication du dispositif mis en œuvre.

- [0077] Afin d'obtenir plusieurs signaux électrochimiques et donc plusieurs signatures électrochimiques pour chaque pathogène, plusieurs matériaux d'électrodes ont été utilisés.
- [0078] Le dispositif de mesure est une plateforme PCB (pour « Printing Circuit Board »), avec 10 électrodes en or : 8 électrodes de travail et une électrode de référence (. Les matériaux, sous forme d'encre, sont déposés sur l'or puis séchés à l'étuve, à 80°C, pendant 2 h. Le dispositif de mesure peut éventuellement comprendre une contre-électrode comme une contre-électrode en une encre carbone commerciale (Dupont BQ242).
- [0079] I.1. Electrodes de travail.
- [0080] Chaque électrode est réalisée en double sur la plateforme afin de s'affranchir d'éventuels problèmes sur un dépôt. Il y a donc 4 encres différentes :
- i) la polyaniline (PANI), dopée avec de l'acide dodecylbenzènesulfonique (DBSA) (encre Pani –DBSA de Rescoll) ;
 - ii) l'oxyde d'iridium (IrOx), oxyde métallique, intégré dans une encre carbone (Dupont BQ242) ;
 - iii) la SunChemical Gwent C2070424P2, encre carbone commerciale avec du bleu de Prusse (Fe(III) ferrocyanure); et
 - iv) l'encre carbone (Dupont BQ242) commerciale.
- [0081] Les encres PANI et IrOx ont une sensibilité connue et stable aux variations de pH tandis que la SunChemical Gwent C2070424P2 et la Dupont BQ242 sont choisies pour la détection d'autres réactions chimiques au sein du milieu.
- [0082] Chaque électrode de travail possède une sous-couche d'encre carbone Dupont BQ242 afin d'améliorer la résistance mécanique du dépôt.
- [0083] I.2. Electrode de référence.
- [0084] Sur l'électrode en or prévue à cet effet, une sous-couche d'encre carbone Dupont BQ242 puis une couche d'encre Ag/AgCl sont déposées. L'encre Ag/AgCl est couramment utilisée en tant que matériau pour pseudo-électrode de référence.
- [0085] Cette électrode étant particulièrement sensible au stress oxydatif induit par la méthode de stérilisation utilisée (l'autoclave), elle est également protégée par une membrane de polyuréthane qui est laissée à sécher pendant 24 h, à température ambiante, après dépôt.
- [0086] I.3. Fabrication du flacon.
- [0087] Une fois la plateforme préparée comme expliqué ci-dessus, elle est intégrée dans un flacon en polypropylène Azlon®. La fente utilisée pour faire passer la connectique à l'extérieur du flacon est étanchéifié par trois méthodes successives :
- ajout de colle cyanoacrylate LOCTITE® 406™, après application d'un activateur,
- [0088] - ajout de colle époxy RS PRO à prise rapide, et

- masquage des joints de colle par du ruban adhésif en Kapton®.

[0089] Grâce à ces précautions, le flacon est totalement étanche et des expériences sans risque de contamination sont possibles.

II. Préparation de l'expérience.

[0090] II.1. Stérilisation préalable.

[0091] Une fois le flacon rempli d'environ 30 mL de milieu de culture BACT/ALERT®, il est autoclavé dans un autoclave Tuttnauer 2540 EL par un cycle « Liquid ». Il subit donc une augmentation de température jusqu'à un plateau à 121°C pendant 15 min. Cette méthode permet de s'assurer de la stérilité des électrodes et du milieu de culture.

[0092] II.2. Protocole d'ensemencement.

[0093] Sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM), 10 mL de sang sont ajoutés dans le flacon. Si l'expérience choisie est un négatif (sans bactérie) alors la mesure est lancée.

[0094] Sinon, le flacon estensemencé avec une certaine quantité de bactéries suivant le protocole expliqué ci-dessous, toutes les manipulations se déroulant sous PSM avec les mesures de sécurité en vigueur.

[0095] Des colonies bactériennes sont ajoutées dans un flacon rempli de 3 mL de diluant pharmaceutique (Diluant pharmacopée européenne - tube 9 mL, VWR AX011144). La turbidité de ce mélange est régulièrement mesurée par un turbidimètre afin d'atteindre une valeur de 0,5 McFarland.

[0096] L'ajout des colonies s'effectue à l'aide d'une oese (ou anse d'inoculation) à partir d'une culture sur boîte de Petri ayant été préparée puis placée à 37°C pendant 24 h.

[0097] Une fois la valeur de 0,5 McFarland atteinte, une dilution en cascade est effectuée dans du diluant pharmaceutique jusqu'à atteindre la concentration bactérienne théorique recherchée.

[0098] Un volume de 0,4 mL de cette dernière dilution est prélevé puis ajouté au flacon de mesure préalablement rempli avec 30 mL de milieu de culture BACT/ALERT® et 10 mL de sang. Il s'agit donc d'un ensemencement au 1/100^{ème}.

[0099] II.3. Protocole de comptage.

[0100] Afin de s'assurer de la quantité réelle inoculée à $t = 0s$ dans le dispositif, des numérations sur boîtes sont réalisées. Pour cela, un volume de 0,1 mL d'une dilution est prélevé puis étalé sur boîte de Petri au râteau.

[0101] Cette numération est effectuée sur les deux dernières dilutions, en triplicat afin de pouvoir faire une moyenne.

III. La méthode de mesure.

[0102] La méthode de mesure électrochimique utilisée est la potentiométrie c'est-à-dire une différence de potentiel entre une électrode de travail et une électrode de référence dont le potentiel ne varie pas dans le temps.

- [0103] Le dispositif étant composé de 8 électrodes de travail, la mesure est multiplexée : toutes les 5 minutes, le potentiel de chaque électrode est enregistré pendant 0,1s.
- [0104] Cette méthode permet d'obtenir 8 courbes de potentiel en fonction du temps. L'expérience a été répétée avec plusieurs bactéries différentes, plusieurs quantités initiales et même sans aucune bactérie afin d'obtenir des négatifs renseignant sur la stabilité de la mesure.
- [0105] La [Fig.1] présente les courbes potentiométriques obtenues après avoir inoculé, à $t = 0$, du sang humain avec 38 cfu de *Escherichia coli* - ATCC 8739. On observe 2 profils caractéristiques de potentiel, un profil « polyaniline » où le potentiel augmente puis diminue lentement, et un profil « encre carbonée » où le profil chute plus ou moins brusquement.
- [0106] Il est clair, au vue des valeurs mesurées, que ce n'est pas la seule variation du pH du milieu de mesure qui est détectée mais d'autres réactions électrochimiques, probablement dues à la sécrétion de métabolites redox.

IV. L'exploitation des signaux.

- [0107] Les milieux biologiques comme le sang utilisé n'étant pas inerte, les électrodes enregistrent des variations de potentiel même sans la présence de bactéries.
- [0108] Pour un contrôle négatif de 5 jours qui correspond au temps standard, en milieu hospitalier, pour décréter la non présence de bactéries, on observe une dérive lente du potentiel pour toutes les électrodes (voir [Fig.2]). Ces variations sont très faibles comparées aux expériences avec bactéries.
- [0109] Afin d'observer plus nettement le début des variations de potentiel dans les cas de bactériémies, la dérivée du potentiel lissée sur 5 points (moyenne glissante sur 5 points) pour chaque électrode est utilisée. Ainsi, on observe la vitesse de modification du potentiel, beaucoup plus parlante et lisible que les courbes potentiométriques brutes.
- [0110] Avantagement, la dérivée lissée du potentiel n'est regardée qu'à partir de 4h d'enregistrement. En effet, les bactéries ont un temps de latence incompressible pendant lequel toute détection est inenvisageable car la croissance bactérienne n'a pas encore commencé.
- [0111] Les courbes présentées à la [Fig.3] sont donc des dérivées (lissées sur 5 points) du potentiel, à partir de $t = 4h$. Comme illustré dans cette figure, la détection est nettement visible et il est possible de calculer un temps de détection.
- [0112] De plus, ici avec l'électrode de polyaniline, on remarque un profil caractéristique de la courbe en fonction de la bactérie détectée. Cette différence de profil étant répétable, il est envisageable de l'utiliser pour orienter l'identification de la bactériémie en parallèle de sa détection.
- [0113] Les différences de profil de courbe sont visibles sur toutes les électrodes mais la polyaniline semble la plus adaptée pour l'identification, les différences étant plus

évidentes. En revanche, la détection est nette pour toutes les électrodes, voire même plus rapide pour les électrodes à base d'encre carbone : oxyde d'iridium, SunChemical Gwent C2070424P2 et Dupont BQ242.

V. Création d'un descripteur.

- [0114] Un descripteur à partir des différentes courbes mesurées sur des électrodes de polyaniline a été créé. Il est cependant tout à fait envisageable de créer un descripteur pour chaque électrode.
- [0115] Ce descripteur permet de déterminer l'espèce bactérienne en fonction du profil de la courbe de la dérivée lissée du potentiel.
- [0116] Pour ce faire, on utilise une base de données obtenue à partir d'expériences réalisées sur sang humain avec différentes bactéries. Le détail de ces expériences est fourni dans le Tableau 1 ci-après.
- [0117] [Tableaux1]

Bactérie	Souche	Inoculum à t = 0 en cfu
<i>Escherichia coli</i>	EC11 – ATCC 2739	10
		10
		100
		100
	EC21 – ATCC 35421	10
		10
		100
		100
	EC10 – ATCC 25922	10
		10
		100
		100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SE26 – ATCC 12228	10
		10
		100
		100
	SE97 – ATCC 35984	10
		10
		100

		100
	SE101 – ATCC NCIMB 8853	10
		10
		100
		100
<i>Klebsiella aerogenes</i>	KA31 – ATCC 13048	10
		10
		100
		100
<i>Enterobacter cloacae</i>	EC8 – ATCC 13047	10
		10
		100
		100
<i>Citrobacter freundii</i>	CF7 – ATCC 8090	10
		10
		100
		100

[0118] Pour chaque expérience, on a deux signaux de polyaniline car il y a deux électrodes de polyaniline par dispositif. Cela représente donc un total de 36 dérivées lissées du potentiel en fonction du temps.

[0119] On commence par supprimer la dépendance au temps des courbes. Par translation, les heures de détection sont placées au même temps (cf [Fig.4]). On obtient donc, pour chaque courbe, un certain nombre de points (1 point toutes les 5 minutes de 20h à 25h sur la [Fig.4]).

[0120] A partir de ces données, on peut utiliser le logiciel Tanagra afin d'effectuer une analyse en composantes principales (PCA) non supervisée. Cette analyse permet de représenter les différents points dans un espace en 3D ([Fig.5]) ou 2D ([Fig.6]).

[0121] On observe, dans la [Fig.5], des zones bien distinctes pour chaque groupement bactérien, confirmant la pertinence de ce descripteur quant à son utilisation pour orienter l'identification du pathogène détecté.

[0122] Avec une telle base de données à compléter avec d'autres bactéries, il est possible de discriminer les bactéries Gram+ des bactéries Gram-, et envisageable d'identifier l'espèce bactérienne.

- [0123] Afin de réduire le nombre de dimension du vecteur, il est également possible d'appliquer une transformée de Fourier à chaque courbe présentée [Fig.4]. Ainsi, on obtient, pour chaque expérience, 17 données correspondant aux 17 fréquences d'intérêt entre 0,1 et 2 Hertz comme montré [Fig.7].
- [0124] On observe une différence assez nette entre les différents groupements de bactéries : *E.coli* / *Autres enterobactéries (KA31, EC8 et CF7)* / *S.epidermidis* .
- [0125] Grâce à ces données, il est possible de faire de l'apprentissage supervisé (ou « support vector machine ») afin d'obtenir un indice de confiance quant à la détermination du Gram de la bactérie en fonction du temps après la détection ([Fig.8]).
- [0126] Le procédé selon l'invention permet donc de déterminer le Gram de la bactérie sans aucune autre manipulation ni aucun produit, contrairement à la réalité hospitalière où la coloration de Gram se fait au microscope après ajout de produits chimiques. Trente minutes après détection, il existe une précision de 82%, 2 h après détection, 90% de précision et, 3 h après détection, 99% de précision. Plus on obtient d'informations, plus il est envisageable de préciser la nature du pathogène détecté.

Références bibliographiques

- [0127] [1] Shrestha *et al*, 2017, "The combined rapid detection and species-level identification of yeasts in simulated blood culture using a colorimetric sensor array", PLoS ONE 12(3): e0173130. doi:10.1371/journal.pone.0173130
- [0128] [2] Templier *et al*, 2017, "Biochips for Direct Detection and Identification of Bacteria in Blood Culture-Like Conditions", 7(1):9457. doi: 10.1038/s41598-017-10072-z.
- [0129] [3] Demande internationale WO 2021/032654 A1 au nom du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, publiée le 25 février 2021.

Revendications

- [Revendication 1] Procédé pour détecter et identifier un micro-organisme contenu dans un échantillon comprenant les étapes consistant à
- a) placer l'échantillon, dans un milieu de culture liquide, en présence d'une électrode de mesure et d'une électrode de référence et dans des conditions adaptées à la croissance des micro-organismes,
 - b) mesurer, au cours du temps, la différence de potentiel entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence,
 - c) calculer la dérivée de la différence de potentiel à partir de la mesure effectuée à l'étape b) moyennant quoi le profil de la dérivée du potentiel est obtenu, et
 - d) détecter et identifier un micro-organisme contenu dans ledit échantillon à partir du profil obtenu à l'étape c).
- [Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit échantillon est choisi dans le groupe constitué par un fluide biologique ; de l'eau comme, par exemple, de l'eau filtrée de grade stérile notamment utilisée dans les installations et la production médicale, de l'eau souterraine, de l'eau de source ou de l'eau de surface ; un prélèvement à partir d'un effluent industriel liquide ; un prélèvement provenant d'une filtration d'air ; et un prélèvement sur un objet.
- [Revendication 3] Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit échantillon est du sang.
- [Revendication 4] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit micro-organisme est choisi dans le groupe constitué par les micro-organismes procaryotes tels que les archées ou les bactéries Gram+ ou Gram-, les microorganismes eucaryotes comme les levures et autres champignons microscopiques et les protistes comme les algues ou protozoaires.
- [Revendication 5] Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite électrode de mesure est une électrode massive en métal, une électrode de verre, une électrode en carbone vitreux, une électrode réalisée sous forme d'un dépôt d'une encre conductrice ou une électrode réalisée sous forme d'un électrodépôt d'un élément conducteur.

- [Revendication 6] Procédé selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce que ladite électrode de référence est réalisée sous forme d'un dépôt d'une encre Ag/AgCl recouverte d'une couche de polymère.
- [Revendication 7] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ladite mesure de la différence de potentiel lors de l'étape b) se fait de façon continue.
- [Revendication 8] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ladite mesure de la différence de potentiel lors de l'étape b) se fait de façon discontinue, ladite étape b) consistant à mesurer la différence de potentiel entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence à une pluralité d'instantanés temporels moyennant quoi des points de mesure de potentiel sont obtenus.
- [Revendication 9] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ledit milieu de culture est soumis à une agitation durant lesdites étapes a) et/ou b).
- [Revendication 10] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ledit procédé comprend une étape supplémentaire consistant à obtenir un profil normalisé de la dérivée du potentiel à partir du profil de la dérivée obtenu à l'étape c).
- [Revendication 11] Système pour détecter et identifier un micro-organisme contenu dans un échantillon susceptible d'être mis en œuvre durant le procédé tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 9 comprenant
- i) un dispositif configuré pour la culture cellulaire en milieu liquide comprenant une électrode de mesure et une électrode de référence,
 - ii) une unité de mesure de la différence de potentiel entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence et configurée pour mesurer la différence de potentiel, en continue et/ou à une pluralité d'instantanés temporels,
 - iii) une unité électronique d'acquisition de la mesure de la différence de potentiel, reliée à l'unité de mesure du potentiel,
 - iv) une unité d'alimentation électrique pour alimenter l'unité électronique d'acquisition, et
 - v) une unité de traitement reliée à l'unité électronique d'acquisition et configurée pour traiter la mesure de la différence de potentiel et calculer, à partir de cette dernière, la dérivée de la différence de potentiel et comportant un module de détection et d'identification d'un micro-organisme par analyse de la dérivée de la différence de potentiel.

[Fig. 1]

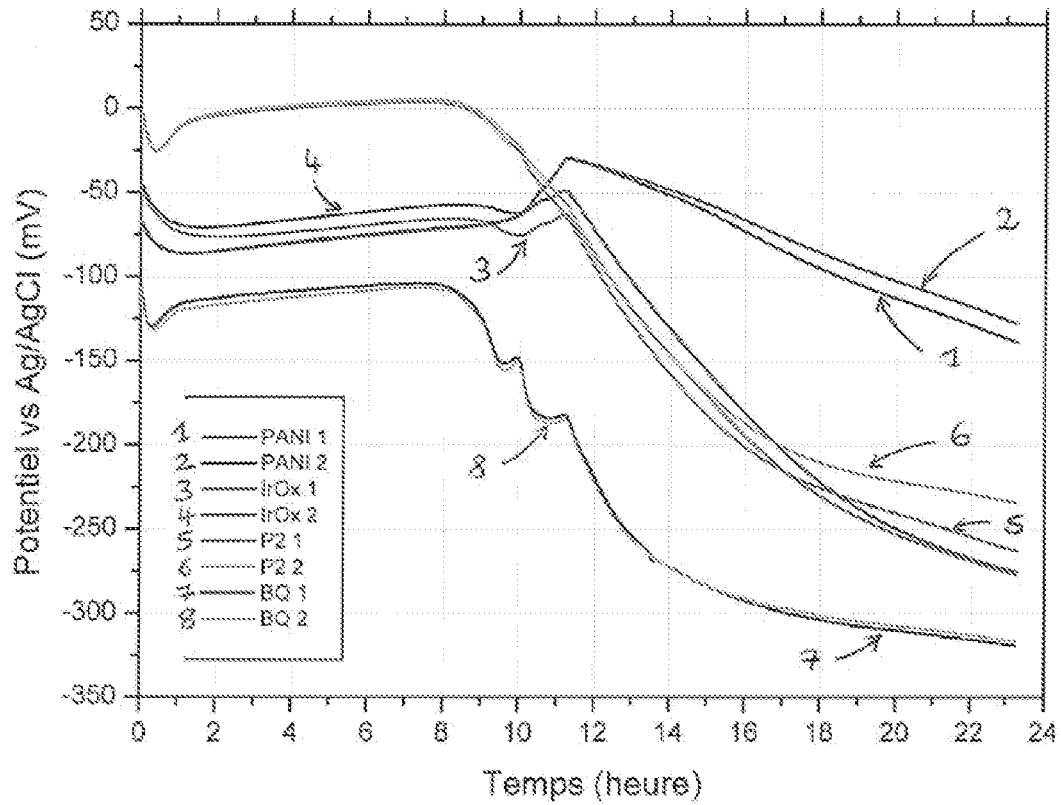


Figure 1

[Fig. 2]

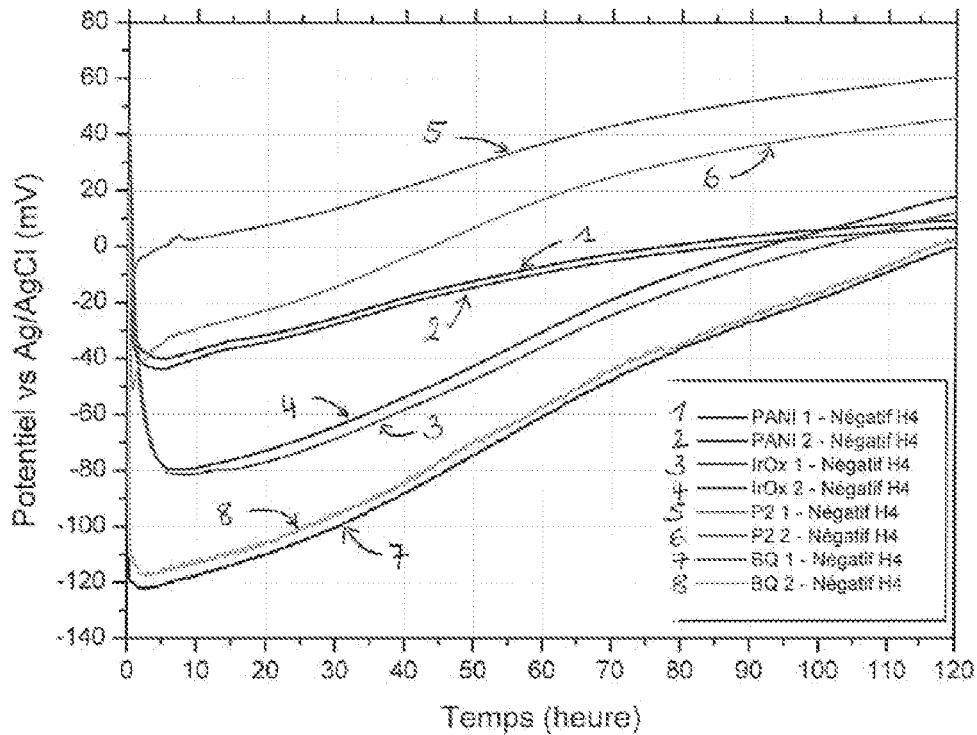


Figure 2

[Fig. 3]

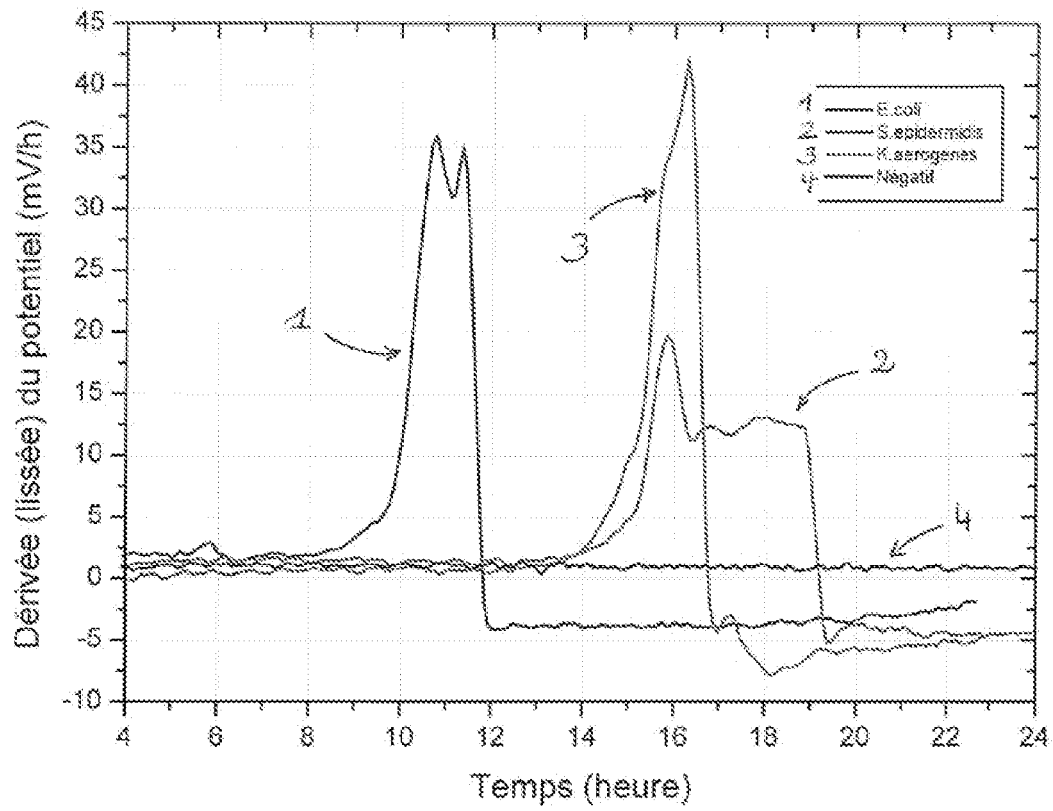


Figure 3

[Fig. 4]

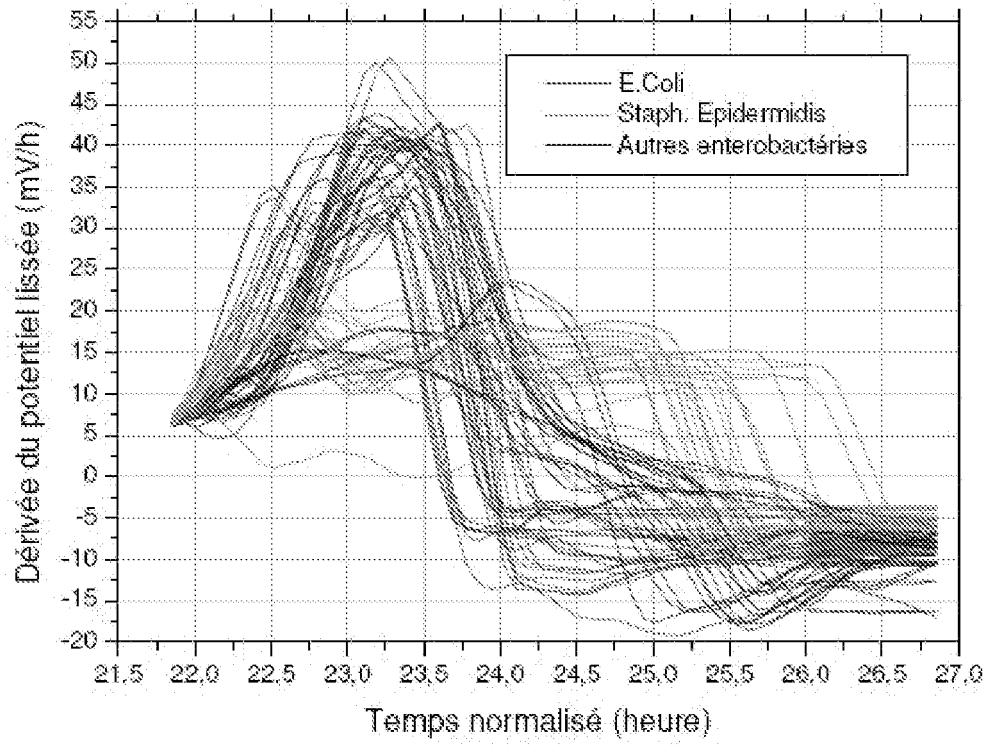


Figure 4

[Fig. 5]

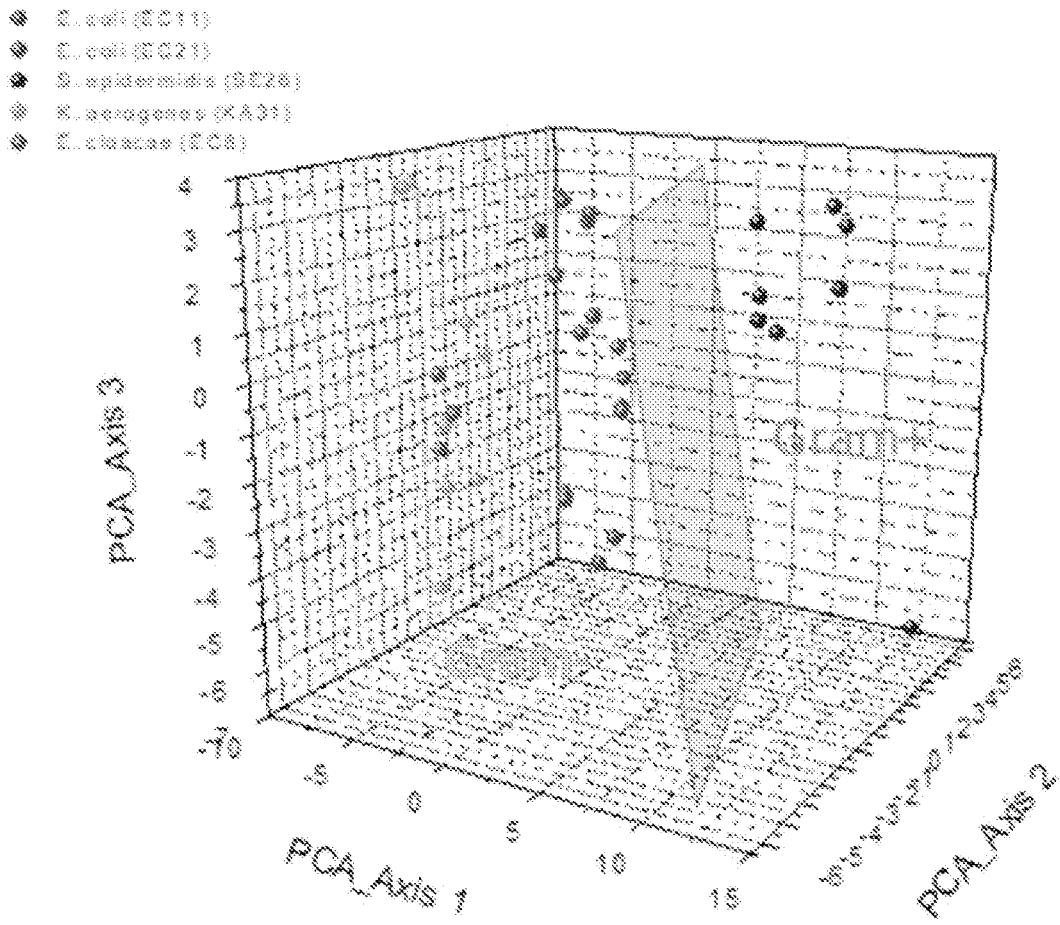


Figure 5

[Fig. 6]

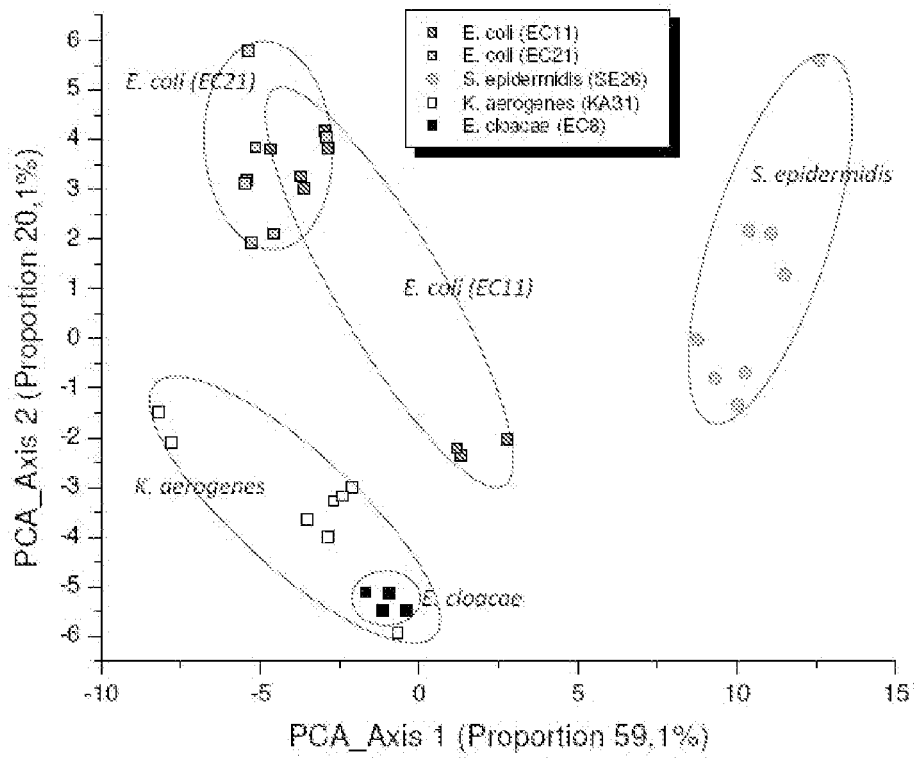


Figure 6

[Fig. 7]

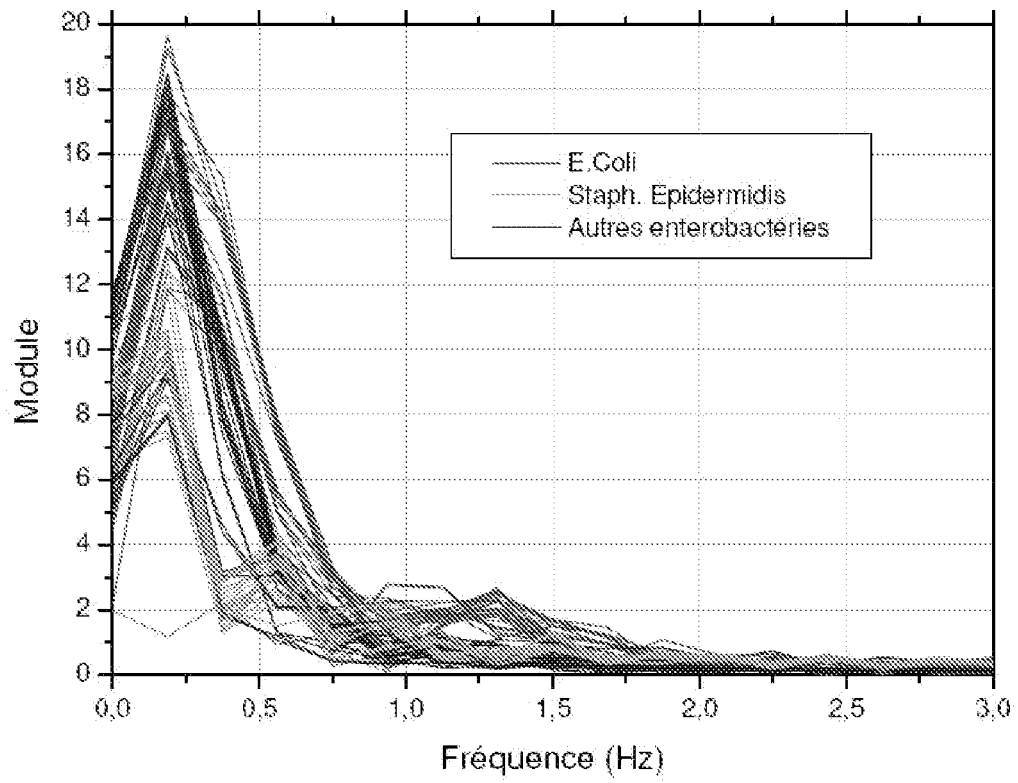


Figure 7

[Fig. 8]

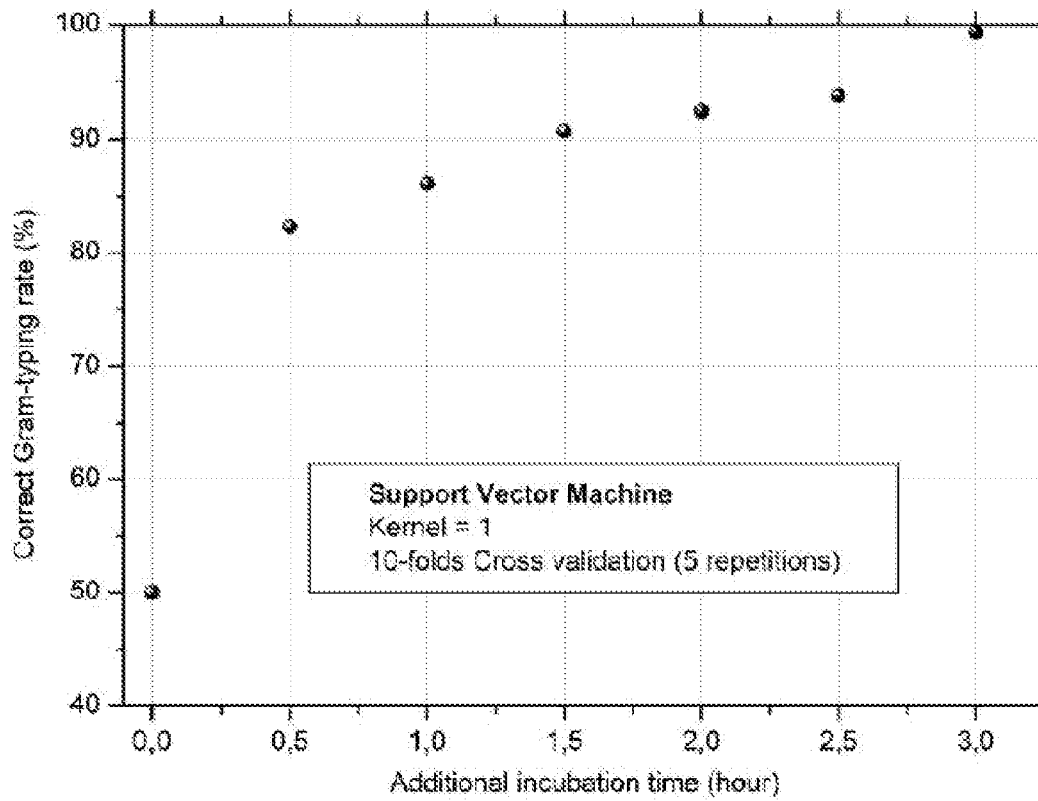


Figure 8

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**

WO 2021/032654 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE
ATOMIQUE [FR])
25 février 2021 (2021-02-25)

FR 2 335 602 A1 (UNIV VIRGINIA [US])
15 juillet 1977 (1977-07-15)

OZIAT JULIE ET AL: "Electrochemical
detection of redox molecules secreted by
Pseudomonas aeruginosa - Part 1:
Electrochemical signatures of different
strains",
BIOELECTROCHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM,
NL,
vol. 140, 28 janvier 2021 (2021-01-28),
XP086602461,
ISSN: 1567-5394, DOI:
10.1016/J.BIOELECHEM.2021.107747
[extrait le 2021-01-28]

US 4 528 270 A (MATSUNAGA TADASHI [JP])
9 juillet 1985 (1985-07-09)

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

NEANT

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

NEANT