

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①① N° de publication : **3 147 814**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②① N° d'enregistrement national : **23 03676**
⑤① Int Cl⁸ : **C 12 N 1/20** (2023.01), C 12 M 1/00

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

②② Date de dépôt : 13.04.23.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 18.10.24 Bulletin 24/42.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥③ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

☐ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : GLOWEE Société par actions simpli-
fiée — FR.

⑦② Inventeur(s) : GELIN Damien, SAGUY Matthieu,
LAVILANIE Pierre, DEBUT Romane, PAOLI Lucie et
HAMEL Yulia.

⑦③ Titulaire(s) : GLOWEE Société par actions simplifiée.

⑦④ Mandataire(s) : IP TRUST.

⑤④ **MILIEU NUTRITIF POUR BACTERIES BIOLUMINESCENTES ET DISPOSITIF POUR SA MISE EN OEUVRE.**

⑤⑦ L'invention se rapporte au domaine des dispositifs bio-
luminescents. Plus particulièrement, l'invention concerne un
milieu nutritif optimisé pour favoriser l'intensité et la durée
de la bioluminescence produite par des bactéries marines
non modifiées génétiquement en particulier les photobacté-
ries des espèces *Photobacterium kishitani* (en particulier
la souche déposée auprès de la CNCM le 16 mars 2023
sous le numéro CNCM I-5938) et *Photobacterium phos-
phoreum*. L'invention concerne également un dispositif lu-
mineux pour la mise en œuvre du milieu nutritif et des
photobactéries de manière optimale.

FR 3 147 814 - A1



Description

Titre de l'invention : MILIEU NUTRITIF POUR BACTERIES BIOLUMINESCENTES ET DISPOSITIF POUR SA MISE EN OEUVRE

[0001] L'invention se rapporte au domaine des dispositifs bioluminescents. Plus particulièrement, l'invention concerne un milieu nutritif optimisé pour favoriser l'intensité et la durée de la bioluminescence produite par des bactéries marines non modifiées génétiquement en particulier les photobactéries des espèces *Photobacterium kishitanii* (en particulier la souche déposée auprès de la CNCM le 16 mars 2023 sous le numéro CNCM I-5938) et *Photobacterium phosphoreum*. L'invention concerne également un dispositif lumineux pour la mise en œuvre du milieu nutritif et des photobactéries de manière optimale.

Domaine de l'invention

[0002] La bioluminescence est un phénomène de production de lumière par les organismes vivants. Les bactéries bioluminescentes sont majoritairement présentes dans le milieu marin sous différentes formes : bactéries isolées (flottantes), biofilms ou encore en symbiose avec une multitude d'organismes marins tel que des poissons, céphalopodes et cnidaires.

[0003] La bactérie bioluminescente la plus étudiée est *Allivibrio fisheri*. Mais d'autres bactéries bioluminescentes ont été trouvées parmi les genres *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aliivibrio*, *Photorhabdus* et *Shewanella*.

[0004] Le mécanisme de production de lumière par les bactéries bioluminescentes met en jeu une chaîne de réactions enzymatiques catalysées par les protéines produites par les gènes de l'opéron luxCDABEG. Les molécules transformées par ces enzymes émettent de la lumière à une longueur d'ondes de 490 nm, ce qui correspond à une couleur bleu-vert. L'intensité de lumière produite par les photobactéries dépend du niveau d'expression de la luciférase LuxAB ainsi que des autres gènes de l'opéron lux. Elle peut également être dépendante du niveau d'expression de gènes responsables de la production de son substrat : la flavine mononucléotide réduit (FMNH₂) ainsi que des aldéhydes à long chaîne qui participent à la réaction de production de lumière.

[0005] Un des facteurs indispensables à la production de bioluminescence est l'apport d'oxygène via une aération de la culture bactérienne. L'oxygène sert d'accepteur d'électrons et permet l'émission de photons lors de la réaction enzymatique catalysée par la luciférase, enzyme clef de la production de lumière. En l'absence d'oxygène, la production de bioluminescence par la culture bactérienne cesse. Elle ne reprendra que lorsque l'aération et donc de l'apport d'oxygène seront à nouveau effectifs.

[0006] D'autres facteurs de contrôle de la bioluminescence sont décrits. Ainsi, l'opéron lux est connu pour être réprimé par la présence de glucose. Le « quorum sensing » est un autre mécanisme permettant le contrôle de l'expression de l'opéron lux chez la bactérie bioluminescente *Vibrio fischeri*. Cette bactérie a la capacité à détecter la densité de sa population et d'activer l'expression de l'opéron lux et la production de lumière lorsque la densité cellulaire atteint un niveau suffisamment élevé. Néanmoins ce mécanisme n'est pas effectif chez les espèces de *Photobacterium phosphoreum* ou *Photobacterium kishitanii* et la lumière produite par ces bactéries est directement proportionnelle à la densité cellulaire.

[0007] La bioluminescence suscite curiosité et intérêt en tant que source d'éclairage liquide et biologique. L'amélioration des performances de production de cette lumière participe à élargir ses champs d'application.

Inconvénients de l'état de l'art

[0008] Sans prendre en compte l'utilisation très répandue de la bioluminescence dans les systèmes génétiquement modifiés, l'utilisation de bactéries bioluminescentes naturelles (sauvages), est limitée aux tests de contamination de l'eau (par exemple kits BioFix Lumi# de Macherey Nagel et Microtox# de Phytocontrol), à la production de lumière dans le cadre d'un système d'illumination d'un dispositif décoratif complexe (brevet WO2018/087504 A1), à des fins éducatives (kits de bioluminescence de Leuchtlabor, Allemagne), dans le cadre d'événements chez des particuliers (brevet FR3122184A1) ou à des fins de création de produits ludiques innovants (brevet WO97/29319). Le milieu de croissance généralement utilisé est un milieu standard pour les bactéries marines de type Marine Broth 2216 ou *Photobacterium* Broth. Or malgré une bonne croissance dans ces milieux, les bactéries bioluminescentes émettent une lumière ayant un niveau d'intensité et une durée d'expression assez faibles et qui limitent son utilisation.

Exposé de l'invention

[0009] Les inventeurs ont développé un milieu nutritif permettant une amélioration significative de l'intensité et de la durée de production de lumière par des bactéries bioluminescentes. Ce milieu est adapté aux photobactéries des espèces *Photobacterium kishitanii* et *Photobacterium phosphoreum*, en particulier à la souche de *Photobacterium kishitanii* déposée auprès de la CNCM le 16 mars 2023 sous le numéro CNCM I-5938.

[0010] Ainsi l'invention concerne un milieu nutritif pour bactéries bioluminescentes comprenant :

- Au moins une source d'azotée choisie parmi un extrait de levure ou de la peptone de levure, la concentration totale en ladite source azotée étant d'au moins 1 g /L (0,1%) ;
 - Au moins une source carbonée choisie parmi (i) du glycérol ou (ii) le gluconate de sodium, la concentration totale en ladite source carbonée étant d'au moins 3 g/L (0,3%) ;
 - Un sel choisi parmi (i) le NaCl à une concentration d'au moins 20 g/L (2%), lorsque ladite source carbonée est du glycérol ou (ii) le NaCl à une concentration d'au moins 20 g/L (2%), ou le KCl à une concentration d'au moins 20 g/L (2%), ou du sel de mer à une concentration d'au moins 38 g/L (3,8%), lorsque ladite source carbonée est le gluconate de sodium
- [0011] ainsi que son utilisation pour cultiver des photobactéries et optimiser leur production de lumière.
- [0012] L'invention concerne également un dispositif bioluminescent incluant un récipient de culture comprenant un système d'oxygénation et un milieu nutritif optimisé pour augmenter la performance lumineuse et des bactéries bioluminescentes appartenant aux espèces *Photobacterium kishitanii* et *Photobacterium phosphoreum*.
- [0013] Ainsi, l'invention concerne un dispositif lumineux comprenant un récipient d'une hauteur d'au moins une dizaine de centimètres comprenant au moins une paroi transparente et disposant d'un système d'oxygénation, un milieu nutritif tel que défini précédemment et au moins une bactérie bioluminescente choisie parmi une bactérie de l'espèce *Photobacterium kishitanii* ou de l'espèce *Photobacterium phosphoreum*.
- [0014] L'invention concerne aussi :
- la souche *Photobacterium kishitanii* déposée auprès de la CNCM le 16 mars 2023 sous le numéro CNCM I-5938, et
 - un kit pour la mise en œuvre d'un procédé de production de bioluminescence
 - un procédé de production de bioluminescence.

Avantages de l'invention

- [0015] La présente invention fournit une solution permettant de pallier les limites de l'utilisation de photobactéries pour la mise en œuvre d'un dispositif bioluminescent pour créer une illumination d'ambiance en proposant un milieu nutritif innovant. Ce milieu nutritif a été développé afin d'optimiser l'intensité et la durée de la bioluminescence et simplifier sa préparation. Il repose sur une formulation optimisée quant aux choix des sources carbonées, azotées et de sels nécessaires à la bonne croissance et au maintien de la culture bactérienne ainsi qu'à la production de bioluminescence.

- [0016] Ce milieu a été développé spécifiquement pour des photobactéries non modifiées génétiquement, de sorte que les cultures bactériennes peuvent être mises en œuvre pour la production de bioluminescence, sans les restrictions liées aux dispositions réglementaires des OGM.
- [0017] Le milieu nutritif est destiné à une utilisation dans un dispositif ne bénéficiant pas d'apport extérieur de nutriments ou de bactéries. Seul un apport d'oxygène est requis ; celui-ci peut être obtenu par un système de bullage (ou équivalent) ou une simple agitation sans système de bullage.
- [0018] Ce dispositif bioluminescent est donc basé sur la culture de bactéries bioluminescentes en milieu liquide. Il se distingue des dispositifs bioluminescents existants par une performance lumineuse plus intense supérieure à 3 lux et une durée accrue de plusieurs heures à 22°C (au moins 12h selon prototypage) sans aucun autre apport en nutriments au cours de la culture.
- [0019] Le dispositif peut émettre de la bioluminescence pendant une durée allant jusqu'à environ 12 heures, ce qui définit sa durée d'utilisation. Du fait de sa simplicité d'utilisation, il peut être utilisé dans des espaces extérieurs et intérieurs, notamment chez des particuliers.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

- [0020] Un premier objet de l'invention concerne un milieu nutritif pour bactéries bioluminescentes comprenant :
- Au moins une source d'azotée choisie parmi un extrait de levure ou de la peptone de levure, la concentration totale en source azotée étant d'au moins 1 g /L (0,1%), de préférence étant comprise entre 1 g à 30 g/L (0,1 à 3%) ;
 - Au moins une source carbonée choisie parmi (i) du glycérol ou (ii) le gluconate de sodium, la concentration totale en source carbonée étant d'au moins 3 g/L (0,3%), de préférence comprise entre 3 g à 12 g/L (0,3 à 1,2%) ;
 - Un sel choisi parmi (i) le NaCl à une concentration d'au moins 20 g/L (2%), de préférence comprise entre 20 à 40 g/L (de 2 à 4%) lorsque la source carbonée est du glycérol ou (ii) le NaCl à une concentration d'au moins 20 g/L (2%), de préférence comprise entre 20 à 40 g/L (de 2 à 4%) ou le KCl à une concentration d'au moins 20 g/L (2%), de préférence comprise entre 20 à 30 g/L (de 2 à 3%) ou du sel de mer à une concentration d'au moins 38 g/L (3,8%), de préférence comprise entre 38 à 40 g/L (de 3,8 à 4%) lorsque la source carbonée est le gluconate de sodium.
- [0021] Dans des modes de réalisation particuliers de l'invention, la quantité de source de carbone est ajustée en fonction de la nature de ladite source, à savoir de préférence entre 3 et 10 g/L pour le glycérol et entre 6 et 12g/L pour le gluconate de sodium.

- [0022] Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le milieu nutritif comprend :
- Au moins une source d'azotée choisie parmi un extrait de levure ou de la peptone de levure, la concentration totale en source azotée étant comprise entre 3 et 12 g/L ;
 - Au moins une source carbonée choisie parmi (i) du glycérol à une concentration comprise entre 3 et 10 g/L ou (ii) le gluconate de sodium à une concentration comprise entre 6 et 12 g/L ;
 - Un sel choisi parmi (i) le NaCl à une concentration comprise entre 20 et 40 g/L lorsque la source carbonée est du glycérol ou (ii) le NaCl à une concentration comprise entre 20 et 40 g/L ou le KCl à une concentration comprise entre 20 et 30 g/L ou du sel de mer à une concentration comprise entre 38 et 40 g/L lorsque la source carbonée est le gluconate de sodium.
- [0023] Dans des modes de réalisation particuliers de l'invention, le milieu nutritif selon l'invention est un milieu comprenant une source carbonée choisie entre un extrait de levure et une peptone de levure et (i) le sel est le chlorure de sodium et la source azotée est le gluconate de sodium (milieu 1), ou (ii) le sel est le chlorure de potassium et la source azotée est le gluconate de sodium (milieu 2), ou (iii) le sel est le sel de mer et la source azotée est gluconate de sodium (milieu 3) ou (iv) le sel est le chlorure de sodium et la source azotée est le glycérol (milieu 4).
- [0024] Le milieu nutritif peut être sous forme de poudre, sauf pour le glycérol qui est sous forme liquide (le milieu est alors fourni pour une part sous forme de poudre et pour l'autre part sous forme liquide, dans deux contenants distincts ; les ingrédients étant ensuite mélangés pour reconstituer le milieu liquide). La forme déshydratée est particulièrement adaptée pour la mise à disposition du milieu et sa reconstitution sous forme liquide dans un dispositif bioluminescent conforme à l'invention. Lorsque du glycérol est présent dans le milieu nutritif, il peut être apporté par exemple grâce à une seringue qui facilite son dosage. Que le milieu soit uniquement sous forme de poudre (lorsque la source carbonée est sous forme de gluconate de sodium), ou que sous forme de poudre pour les sources azotées et le sel et sous forme liquide pour la source carbonée (lorsque celle-ci est du glycérol), le milieu nutritif sera reconstitué de la même manière en mélangeant les ingrédients dans de l'eau.
- [0025] Ainsi, au sens de l'invention, le terme « milieu nutritif sous forme de poudre » s'oppose à « milieu nutritif liquide prêt-à-l'emploi » et inclut la forme poudre complète et la forme poudre avec ajout de glycérol.
- [0026] Un deuxième objet de l'invention concerne l'utilisation d'un milieu nutritif tel que décrit précédemment pour cultiver des photobactéries de l'espèce *Photobacterium kishitanii* ou *Photobacterium phosphoreum*.

- [0027] Ces bactéries sont des bactéries naturelles, c'est-à-dire non modifiées génétiquement, aussi appelées bactéries sauvages.
- [0028] Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la bactérie est une souche de *Photobacterium kishitanii* déposée auprès de la CNCM le 16 mars 2023 sous le numéro CNCM I-5938
- [0029] Un troisième objet de l'invention concerne la souche de *Photobacterium kishitanii* déposée auprès de la CNCM le 16 mars 2023 sous le numéro CNCM I-5938 en tant que telle.
- [0030] Cette souche n'a jamais été décrite auparavant. Il s'agit d'une bactérie bioluminescente dont les performances de production lumineuse sont améliorées grâce au milieu nutritif selon l'invention.
- [0031] Un quatrième objet de l'invention concerne un dispositif lumineux comprenant un récipient d'une hauteur d'au moins une dizaine de centimètres comprenant au moins une paroi transparente et disposant d'un système d'oxygénation, un milieu nutritif tel que décrit précédemment et une bactérie bioluminescente choisie parmi une bactérie de l'espèce *Photobacterium kishitanii* ou de l'espèce *Photobacterium phosphoreum*
- [0032] Le volume du récipient n'est pas une contrainte. Il peut par exemple contenir de 50 ml à 50L et plus en adaptant les paramètres d'apport d'air. La forme du récipient et sa taille peuvent être variables, mais sera de préférence de forme verticale pour favoriser l'oxygénation. Le diamètre sera préférentiellement d'au moins 5 cm de diamètre. Le récipient doit disposer d'ouvertures libres dans sa partie supérieure pour permettre l'évacuation de l'air injecté.
- [0033] Le récipient peut être totalement ou partiellement transparent en fonction de l'effet recherché.
- [0034] Par « système d'oxygénation », on entend tout système permettant l'apport d'oxygène dans le milieu nutritif. Cet apport d'oxygène est de préférence obtenu par introduction d'air dans le milieu nutritif, ce passage d'air sous forme de bulles dans le milieu assurant une dissolution d'oxygène alors disponible pour les bactéries bioluminescentes. Tout système de bullage est donc adapté, quel que soit la taille des bulles. L'air peut être introduit dans le milieu via une perforation dans la paroi du récipient, un tuyau, des buses ou tout autre moyen équivalent. Ce système d'oxygénation peut aussi consister en un système permettant une agitation du milieu suffisante à l'apport d'oxygène.
- [0035] Dans un cinquième objet, l'invention peut être proposée sous la forme d'un kit comprenant un récipient comprenant un système d'oxygénation, un milieu nutritif sous forme de poudre et des bactéries bioluminescentes de l'espèce *Photobacterium kishitanii* ou de l'espèce *Photobacterium phosphoreum* sous forme lyophilisée.

[0036] Le milieu nutritif dans le kit (milieu à reconstituer) peut être uniquement sous forme de poudre lorsque la source carbonée est apportée par du gluconate de sodium. Lorsque la source carbonée est apportée par du glycérol, celui-ci est présent dans le kit dans un contenant additionnel du fait de sa forme liquide ; cela ne change rien au principe du kit, puisqu'il suffit de mélanger les ingrédients (poudre + glycérol) à de l'eau pour reconstituer un milieu nutritif prêt-à-l'emploi. Ceci est expliqué précédemment.

[0037] Un sixième objet de l'invention concerne un procédé de mise en œuvre d'une bioluminescence comprenant les étapes suivantes :

- Mettre dans un récipient d'une hauteur d'au moins une dizaine de centimètres comportant un système d'oxygénation de l'eau et un milieu nutritif tel que décrit précédemment sous forme de poudre afin de reconstituer un milieu nutritif liquide ;
- Ajouter les bactéries bioluminescentes de l'espèce *Photobacterium kishitanii* ou de l'espèce *Photobacterium phosphoreum* sous forme lyophilisée
- Activer ledit système d'oxygénation
- Cultiver ainsi les bactéries pendant au moins 10h pour voir apparaître la lumière.
- Poursuivre la culture pendant la durée voulue ou jusqu'à extinction de la bioluminescence.

[0038] Le milieu peut être reconstitué par ajout d'eau, en particulier d'eau de ville, mais tout type d'eau peut convenir.

[0039] La présente invention sera mieux comprise à la lecture des exemples qui suivent, fournis à titre d'illustration et ne devant en aucun cas être considérés comme limitant la portée de la présente invention.

DESCRIPTION DES FIGURES

[0040] [Fig.1][Fig.1] : **Comparaison de la performance lumineuse des milieux avec les sources de carbone revendiqués.**

[0041] [Fig.2][Fig.2] : **A - Cinétique de production de bioluminescence en milieu avec glycérol et une gamme de concentrations de NaCl. B – Cinétique de production de bioluminescence en milieu avec gluconate de sodium et une gamme de concentrations de NaCl.**

[0042] [Fig.3][Fig.3] : **A - Cinétique de production de bioluminescence dans un milieu contenant du gluconate de sodium et une gamme de concentrations de KCl. B - Cinétique de production de bioluminescence dans un milieu contenant du glycérol et une gamme de concentrations de KCl.**

[0043] [Fig.4][Fig.4] : **A - Cinétique de production de bioluminescence dans un milieu contenant du gluconate de sodium et une gamme de concentrations de sels de mer. B - Cinétique de production de bioluminescence dans un milieu avec glycérol et une gamme de concentrations de sels de mer.**

[0044] [Fig.5][Fig.5] : **Comparaison de la performance lumineuse des photobactéries cultivées soit dans le milieu nutritif selon l'invention, soit dans un milieu du commerce.**

EXEMPLES

[0045] Les inventeurs ont réalisé des tests exhaustifs pour définir les composants du milieu et leurs concentrations optimales pour favoriser l'expression de la bioluminescence. Typiquement le milieu nutritif pour les bactéries est composé d'une source de carbone (sucres et leurs dérivés), d'une source d'azote (protéines, peptides, acides aminés), de vitamines et de sels minéraux.

EXEMPLE 1#: Matériels et méthodes

Développement du milieu de culture

[0046] Les bactéries sont disponibles sous forme lyophilisées. Les conditions de remise en culture pour l'analyse en microplaques sont les suivantes : les microplaques à 96 puits de type Corning Costar® Assay Black with Clear Flat Bottom (Référence 3904) contiennent 200 µl de culture par puit. Ils sontensemencés avec une préculture à une densité optique (DO) de 0,1 au lancement.

[0047] Pour les expériences comparatives, chaque puit contient des concentrations déterminées pour tous les ingrédients sauf celui testé qui est ajouté à des concentrations variables. La croissance et le niveau de bioluminescence sont suivis sur 24-60H dans un lecteur de microplaques de type Tecan Te-Cool Spark® avec contrôle de température (22°C). Les données de bioluminescence sont présentées en unités relatives de lumière (RLU – relative light units) non-standardisés.

[0048] Les conditions utilisées pour l'analyse présenté sur la [Fig.5] consistent en ensemencement de 50 ml de milieu à la DO 0,1 au lancement. Les milieux ensemencés sont mis en agitation à 150 rpm dans des flacons de 250 ml de type Erlenmeyer fond à baffles dans un incubateur à la température de 22 °C pendant 22 heures. Les données de bioluminescence sont recueillies par un dispositif électronique avec des capteurs de lumières calibrés avec un luxmètre (modèle T-10A Konica Minolta). Un groupe de plusieurs capteurs est connecté à un microcontrôleur qui date et envoie les données à un serveur. Ainsi l'intensité de lumière émise par les cultures est suivie pendant le temps voulu, typiquement sur 24-72H.

[0049] Dispositif mis en œuvre pour la culture bactérienne

- [0050] Le milieu décrit précédemment est utilisé pour cultiver les bactéries bioluminescentes dans un récipient permettant l'oxygénation de la culture, l'oxygène étant nécessaire à l'émission de lumière. Le récipient doit être transparent, et peut être de taille et de forme variables avec une hauteur suffisante d'au moins une dizaine de cm. Il doit être alimenté par un bullage d'air ou tout autre dispositif équivalent qui permet le brassage et l'oxygénation de la culture bactérienne. Il doit aussi être équipé d'ouvertures libres dans sa partie supérieure pour permettre l'évacuation de l'air injecté.
- [0051] Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le récipient est cylindrique d'une hauteur de 100 cm et de 5-20 cm de diamètre (tuyau). L'injection d'air filtré se fait par la base du cylindre à l'aide d'un compresseur ou d'une pompe à air. Dans un autre mode de réalisation, le récipient est plat pour servir d'un panneau d'affichage, de 1-3 cm d'épaisseur, 500 à 1000 mm de hauteur et de largeur variable. Il doit avoir des points d'injection d'air dans sa partie basse. Le récipient peut être également une bouteille ou un bidon en verre fermée par un bouchon à vis équipé de tuyaux d'alimentation en air. Le dispositif peut être utilisé sans apport d'air (bullage) dans différents contenant (tube, bouteilles, erlenmeyers) soumis à une agitation mécanique (dispositif d'agitation interne ou plaque agitante).
- [0052] **EXEMPLE 2 : Détermination de sources de carbone et de sels dans le milieu de culture pour optimiser la bioluminescence**
Choix de la source carbonée
- [0053] L'opéron lux est connu pour être réprimé par la présence de glucose, mécanisme nommé « répression par catabolite ». Les inventeurs ont confirmé cette répression en utilisant le glucose comme source de carbone principale. Le niveau de lumière produite par les bactéries en présence de glucose est comparable avec celui produit en absence de source de carbone supplémentaire ([Fig.1]).
- [0054] Afin de sélectionner la meilleure source de carbone pour favoriser la production de lumière par les photobactéries, les inventeurs ont réalisé une étude comparative incluant un large spectre de sucres et ses dérivés. Ces expérimentations ont été réalisées dans un lecteur de microplaques (section Matériel et Méthodes). La [Fig.1] montre la production de lumière en fonction de différentes sources carbonées présentes dans le milieu de culture. Elle rapporte une augmentation très significative de l'intensité de lumière émise par les bactéries en présence de deux meilleures sources de carbone que les inventeurs ont sélectionnées : glycérol et gluconate de sodium, par rapport à celle observée en présence de milieu sans source de carbone supplémentaire (ainsi qu'en présence de glucose, comme décrit précédemment).
- [0055] Détermination de la nature et de la quantité de sels

- [0056] Le milieu naturel des bactéries marines étant l'eau de mer, il est primordial de maintenir un niveau osmotique élevé de son milieu de croissance (à titre indicatif, la concentration de l'ensemble de sels dans l'eau de mer est comprise entre 30 et 40 g/L). La concentration de sels impactant directement la bioluminescence, les inventeurs ont effectué les tests de croissance et de production de lumière en microplaques avec des gammes de concentrations pour différents sels : sel de mer, NaCl, et KCl. Des gammes de chacun de ses 3 sels ont été testés successivement avec chacune des deux sources carbonées sélectionnées.
- [0057] Les résultats obtenus avec le NaCl sont présentés à la [Fig.2]. Ils montrent que la concentration optimale de NaCl pour la production de lumière se situe entre 20 à 40 g/L, que la source carbonée soit le glycérol ([Fig.2A]) ou le gluconate ([Fig.2B]).
- [0058] Une analyse similaire a été effectuée avec le chlorure de potassium et le sel de mer. Les résultats obtenus avec le chlorure de potassium sont présentés à la [Fig.3]. Les résultats obtenus avec le sel de mer sont présentés à la [Fig.4].
- [0059] Ils montrent qu'en présence de glycérol, le niveau de bioluminescence obtenu avec KCl et le sel de mer n'est pas satisfaisant alors qu'en présence de gluconate de sodium, les deux sources de sel peuvent être utilisés à hauteur de 20-30 g/L pour KCL et 38-40 g/L pour le sel de mer.

Choix de la source azotée

- [0060] Les sources d'azote retenues par les inventeurs sont préférentiellement l'extrait de levure ou la peptone de levure à la concentration au moins 1 g/L (0,1%), de préférence entre 1 g/L à 30 g/L.
- [0061] L'extrait de levure ou la peptone de levure contenant les vitamines et les microéléments nécessaires à la croissance de la culture bactérienne, l'ajout de composants supplémentaires n'est pas utile car il n'augmente pas le niveau de bioluminescence.

Exemples de milieux de culture selon l'invention

- [0062] Le milieu de culture optimisées selon l'invention pour la meilleure performance lumineuse comprend les composants suivants dans les quantités et proportions pondérales suivantes pour 1L :
- [0063] Milieu 1 : au moins 1 g (0,1%), de préférence de 1 g à 30 g (0,1 à 3%) d'une source d'azote, de préférence choisie entre un extrait de levure et une peptone de levure, au moins 20 g (2%), de préférence de 20 g à 40 g (2 à 4%) de chlorure de sodium (NaCl), au moins 6 g (0,6%), de préférence de 6 g à 12 g (0,6 à 1,2%) de gluconate de sodium
- [0064] Milieu 2 : au moins 1 g (0,1%), de préférence de 1 g à 30 g (0,1 à 3%) d'une source d'azote, de préférence choisie entre un extrait de levure et une peptone de levure, au moins 20 g (2%), de préférence de 20 g à 30 g (2 à 3%) de chlorure de potassium

(KCl), au moins 6 g (0,6%), de préférence de 6 g à 12 g (0,6 à 1,2%) de gluconate de sodium

[0065] Milieu 3 : au moins 1 g (0,1%), de préférence de 1 g à 30 g (0,1 à 3%) d'une source d'azote, de préférence choisie entre un extrait de levure et une peptone de levure, au moins 38 g (3,8%), de préférence de 38 g à 40 g (3,8 à 4%) de sels de mer, au moins 6 g (0,6%), de préférence de 6 g à 12 g (0,6 à 1,2%) de gluconate de sodium

[0066] Milieu 4 : au moins 1 g (0,1%), de préférence de 1 g à 30 g (0,1 à 3%) d'une source d'azote, de préférence choisie entre un extrait de levure et une peptone de levure, au moins 20 g (2%), de préférence de 20 g à 40 g (2 à 4%) de NaCl, au moins 3 g (0,3%), de préférence de 3 g à 10 g (0,3 à 1%) de glycérol

[0067] Ces milieux sont fournis sous forme de poudre et sont repris dans l'eau de ville par l'utilisateur.

[0068] **E X E M P L E 3 : Comparaison entre la bioluminescence obtenue avec un milieu nutritif standard et celle obtenue avec le milieu nutritif selon l'invention**

[0069] La bioluminescence produite par les bactéries cultivées dans le milieu nutritif selon l'invention a été comparée à celle cultivée dans un milieu standard commercial : il a été établi que le milieu nutritif selon l'invention permet la production d'une bioluminescence nettement supérieure à la fois en intensité et en durée. Ces résultats sont présentés à la [Fig.5].

[0070] Les performances lumineuses obtenues grâce au milieu nutritif selon l'invention présentent les caractéristiques suivantes : une intensité lumineuse supérieure à 3 lux pendant au moins 10h pour une culture de 200 ml dans des flacons à baffle de 1 L agités à 150 rpm et à 22°C ou dans les tuyaux alimentés en air et ceux sans aucun autre apport en nutriments au cours de la culture. Le pic de bioluminescence supérieur à 3 lux correspond à la DO entre 2 et 5, le sommet du pic se situant à la DO 3,5-4.

[0071] **EXEMPLE 4 : Exemple d'utilisation d'un dispositif selon l'invention**

[0072] Les bioréacteurs peuvent être utilisés dans le cadre d'un événement comme dispositif lumineux ou décoratif, ils peuvent servir d'éclairage et de support d'information intérieur ou extérieur.

[0073] Par exemple ce dispositif peut être utilisé dans le cadre d'un kit destiné aux particuliers. Le kit contient un mini-bioréacteur d'une forme cylindrique de préférence de 10 à 30 cm de hauteur et de 2 à 10 cm de diamètre. Il est alimenté en air par la base à l'aide d'un compresseur intégré. Le milieu nutritif performant est fourni en poudre. Les bactéries bioluminescentes sont fournies sous forme déshydraté (poudre lyophilisée) en quantité correspondant à 1 ml de culture concentrées à 10-25 DO/ml. La mise en culture de la bactérie se fait en reprenant les bactéries lyophilisées dans le milieu préparé par le particulier à partir du milieu en poudre et d'eau de ville.

Revendications

[Revendication 1]

Milieu nutritif pour bactéries bioluminescentes comprenant :

- a. Au moins une source d'azotée choisie parmi un extrait de levure ou de la peptone de levure, la concentration totale en source azotée étant d'au moins 1 g /L (0,1%) de préférence entre 1 et 30 g/L (0,1 – 3%) ;
- b. Au moins une source carbonée choisie parmi (i) du glycérol ou (ii) le gluconate de sodium, la concentration totale en source carbonée étant d'au moins 3 g/L (0,3%) de préférence entre 3 et 10 g/L (0,3 – 1%) pour glycérol et entre 6 et 12 g /L (0,6 – 1,2%) pour gluconate de sodium ;
- c. Un sel choisi parmi (i) le NaCl à une concentration d'au moins 20 g/L (2%), de préférence entre 20 et 40 g/L (2 – 4%), lorsque la source carbonée est du glycérol ou (ii) le NaCl à une concentration d'au moins 20 g/L (2%), de préférence entre 20 et 40 g/L (2 – 4%), ou le KCl à une concentration d'au moins 20 g/L (2%), de préférence entre 20 et 30 g/L (2 – 3%), ou du sel de mer à une concentration d'au moins 38 g/L (3,8%), de préférence entre 38 et 40 g/L (3,8 – 4%), lorsque la source carbonée est le gluconate de sodium.

[Revendication 2]

Milieu nutritif selon la revendication 1 dans lequel (i) ledit sel est le chlorure de sodium et ladite source carbonée est le gluconate de sodium, ou (ii) ledit sel est le chlorure de potassium et ladite source carbonée est le gluconate de sodium, ou (iii) ledit sel est le sel de mer et ladite source carbonée est gluconate de sodium ou (iv) ledit sel est le chlorure de sodium et ladite source carbonée est le glycérol

[Revendication 3]

Milieu nutritif selon l'une des revendications 1 ou 2 sous forme de poudre.

[Revendication 4]

Utilisation d'un milieu nutritif tel que défini l'une des revendications 1 à 3 pour cultiver des photobactéries de l'espèce *Photobacterium kishitanii* ou *Photobacterium phosphoreum*.

[Revendication 5]

Dispositif lumineux comprenant un récipient d'une hauteur d'au moins une dizaine de centimètres comprenant au moins une paroi transparente et disposant d'un système d'oxygénation, un milieu nutritif selon l'une des revendications 1 à 2 et au moins une bactérie bioluminescente choisie parmi une bactérie de l'espèce

Photobacterium kishitanii ou de l'espèce *Photobacterium phosphoreum*.

[Revendication 6]

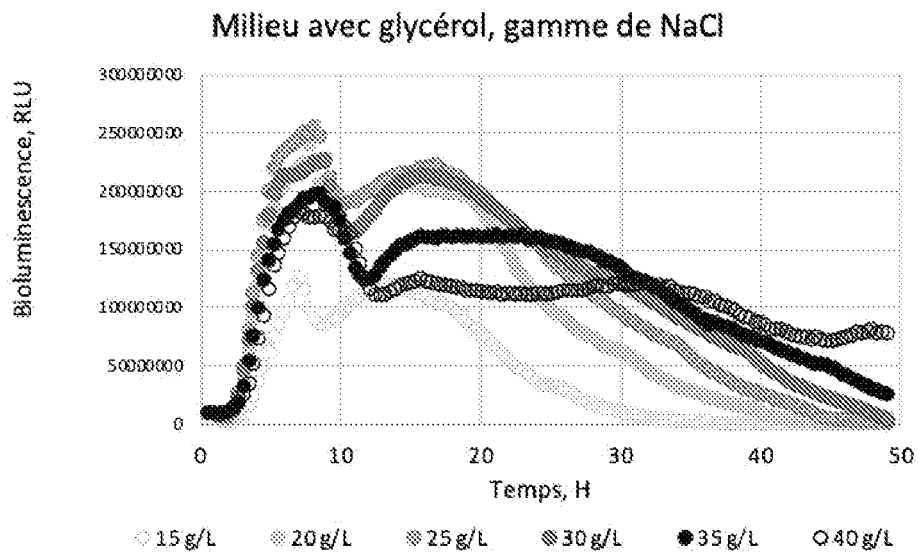
Kit pour la production de bioluminescence comprenant un récipient d'une hauteur d'au moins une dizaine de centimètres comprenant un système d'oxygénation, un milieu nutritif sous forme de poudre tel que défini à la revendication 3 et des bactéries bioluminescentes de l'espèce *Photobacterium kishitanii* ou de l'espèce *Photobacterium phosphoreum* sous forme lyophilisée.

[Revendication 7]

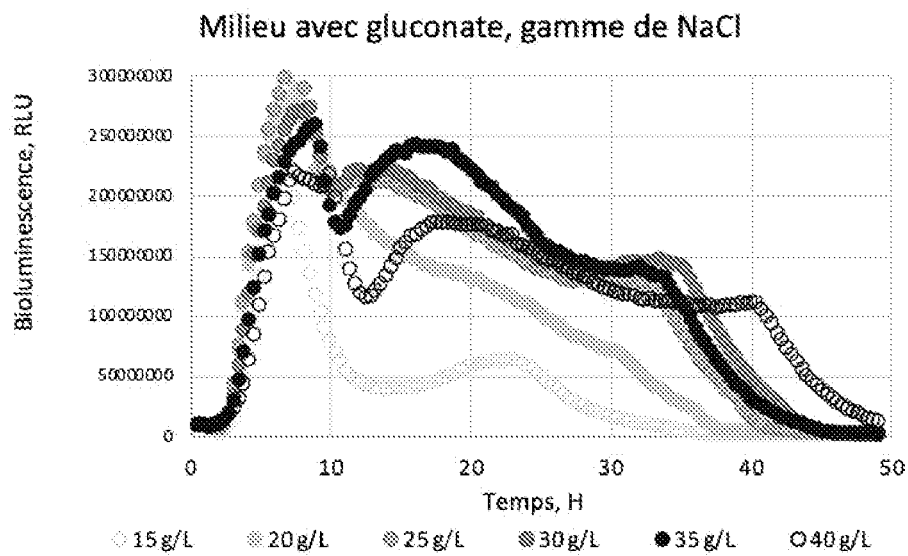
Procédé de mise en œuvre d'une bioluminescence comprenant les étapes suivantes :

- Mettre dans un récipient comportant un système d'oxygénation de l'eau de ville et un milieu nutritif tel que défini à la revendication 3 afin de reconstituer un milieu nutritif liquide ;
- Ajouter les bactéries bioluminescentes de l'espèce *Photobacterium kishitanii* ou de l'espèce *Photobacterium phosphoreum* sous forme lyophilisée ;
- Activer ledit système d'oxygénation ;
- Cultiver ainsi les bactéries pendant au moins 10h pour voir apparaître la lumière ;
- Poursuivre la culture pendant la durée voulue ou jusqu'à extinction de la bioluminescence.

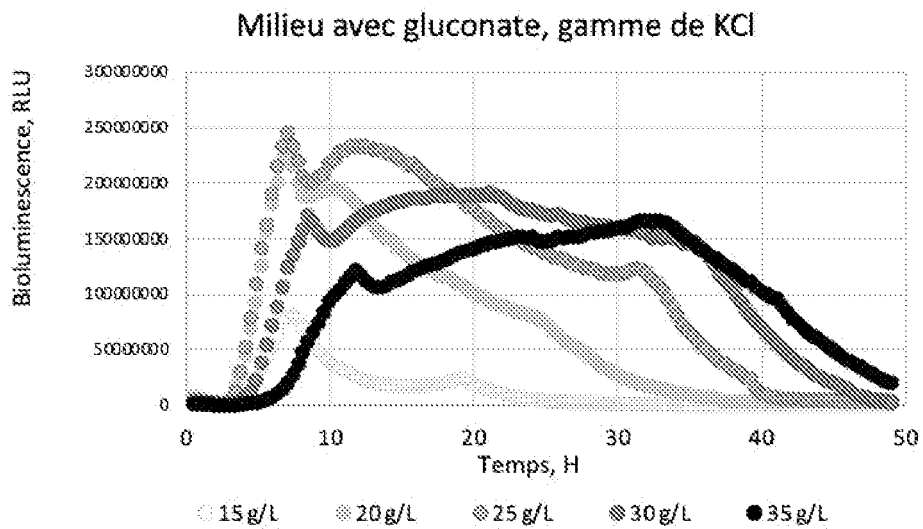
[Fig. 1]



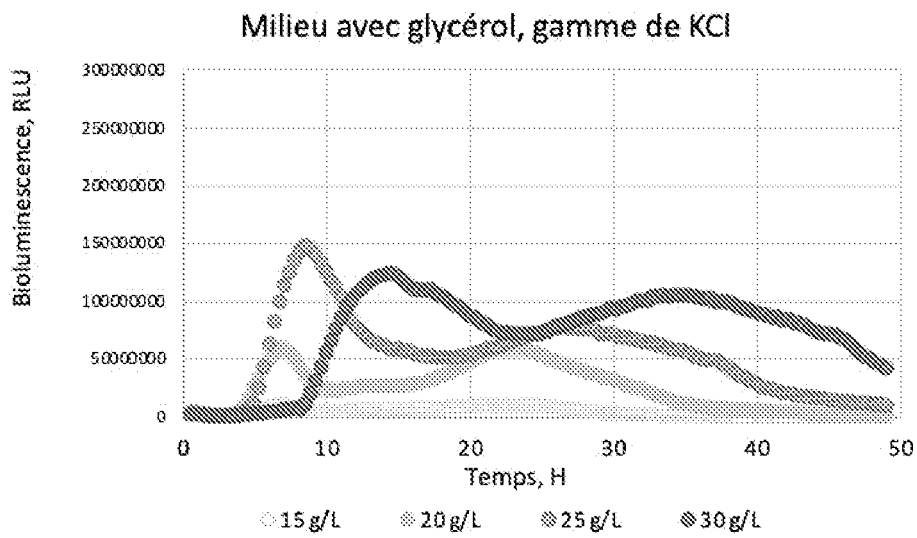
[Fig. 2A]



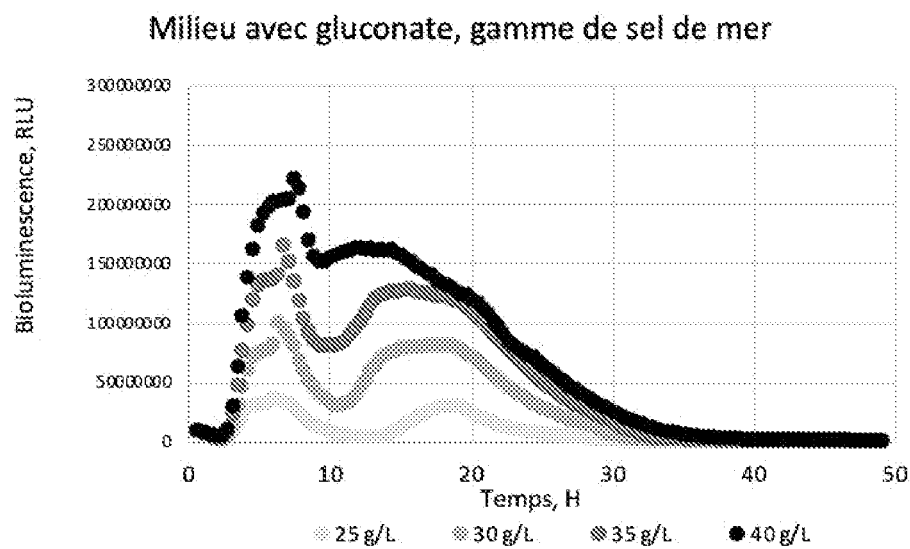
[Fig. 2B]



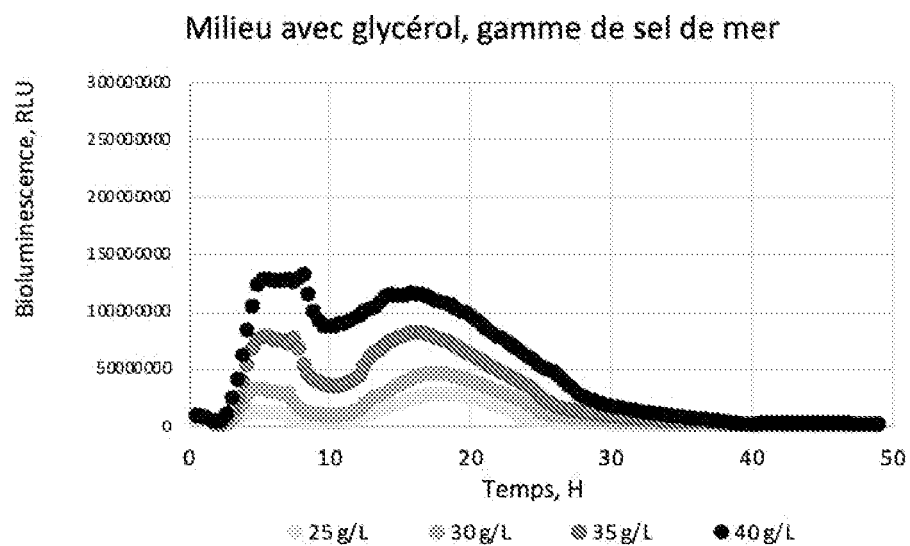
[Fig. 3A]



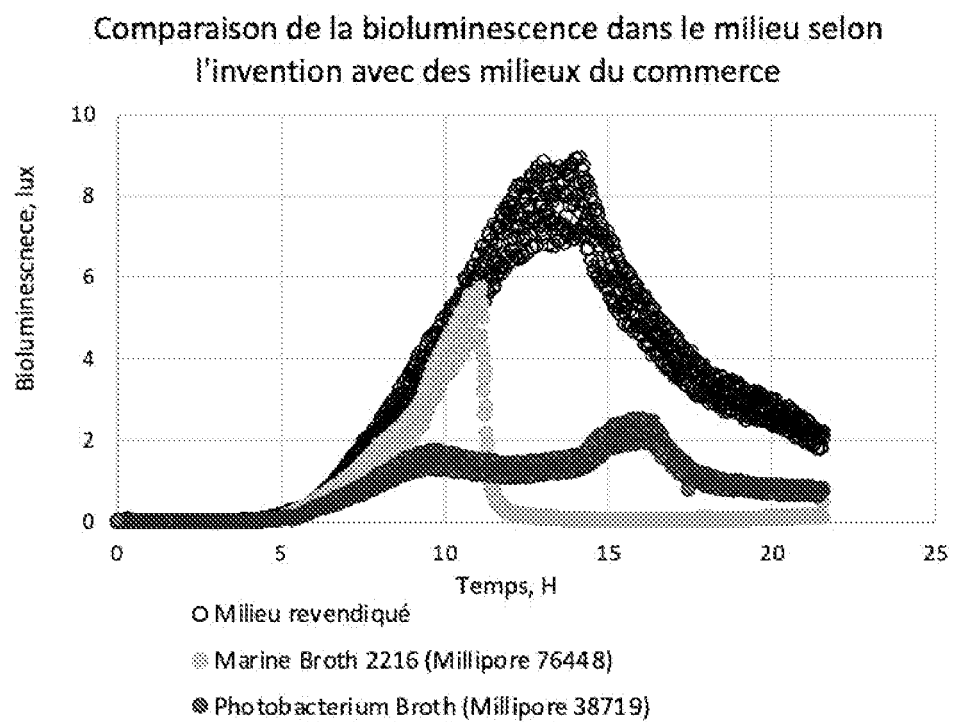
[Fig. 3B]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 930831
FR 2303676

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	BE 870 833 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 15 janvier 1979 (1979-01-15) * le document en entier * * en particulier : abrégé ; revendications 1-17 ; figures 1, 2 ; exemples * -----	1 - 7	C12M 1/00 C12N 1/20
X	CH 619 731 A5 (ANVAR [FR]) 15 octobre 1980 (1980-10-15) * le document en entier * * en particulier : abrégé ; revendications 1-12 ; exemples * -----	1 - 7	
X	US 4 129 644 A (KALOPISSIS GREGOIRE ET AL) 12 décembre 1978 (1978-12-12) * le document en entier * * en particulier : abrégé ; revendications 1-8 ; exemples * -----	1 - 7	
X	FR 2 225 443 A1 (ANVAR [FR]) 8 novembre 1974 (1974-11-08) * le document en entier * * en particulier : abrégé ; revendications 1-16 ; exemples * -----	1 - 7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	FR 3 122 184 A1 (TANGRAM ARCH [FR] ; INSTITUT DE RECH POUR LE DEVELOPPEMENT [FR] ET AL.) 28 octobre 2022 (2022-10-28) * le document en entier * -----	1 - 7	C12N C12R
A	EP 0 493 264 A1 (SANOFI ELF [FR] ; ELF AQUITAINE [FR]) 1 juillet 1992 (1992-07-01) * le document en entier * -----	1 - 7	
- / - -			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
5 septembre 2024		Ferreira, Roger	
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			

3

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 930831
FR 2303676

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	TANET LISA ET AL: "Bacterial Bioluminescence: Light Emission in Photobacterium phosphoreum Is Not Under Quorum-Sensing Control", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, vol. 10, 4 mars 2019 (2019-03-04), XP093201159, Lausanne ISSN: 1664-302X, DOI: 10.3389/fmicb.2019.00365 Extrait de l'Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/artic les/PMC6409340/pdf/fmicb-10-00365.pdf> * le document en entier * -----	1-7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
5 septembre 2024		Ferreira, Roger	
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	

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE **RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2303676 FA 930831**

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 **05 - 09 - 2024**
 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
BE 870833	A	15-01-1979	BE 870833 A	15-01-1979
			CA 1103050 A	16-06-1981
			DE 2841896 A1	29-03-1979
			FR 2404847 A1	27-04-1979
			GB 2005018 A	11-04-1979
			JP S5458492 A	11-05-1979
			JP S5728272 B2	15-06-1982
			NL 7809821 A	30-03-1979
			SE 462166 B	14-05-1990

CH 619731	A5	15-10-1980	AU 6791974 A	16-10-1975
			BE 813485 A	09-10-1974
			CH 619731 A5	15-10-1980
			CH 619981 A5	31-10-1980
			DE 2417508 A1	07-11-1974
			GB 1428898 A	17-03-1976
			IT 1059681 B	21-06-1982
			JP S5040785 A	14-04-1975
			JP S5813147 B2	11-03-1983
			NL 7405019 A	18-10-1974

US 4129644	A	12-12-1978	BE 834483 A	14-04-1976
			CA 1063028 A	25-09-1979
			CH 609862 A5	30-03-1979
			DE 2545986 A1	29-04-1976
			FR 2287899 A1	14-05-1976
			GB 1497950 A	12-01-1978
			IT 1048236 B	20-11-1980
			JP S5163949 A	02-06-1976
			JP S5910324 B2	08-03-1984
			LU 71110 A1	11-11-1976
			US 4129644 A	12-12-1978

FR 2225443	A1	08-11-1974	AT 339242 B	10-10-1977
			CA 1023285 A	27-12-1977
			FR 2225443 A1	08-11-1974
			US 3997402 A	14-12-1976
			ZA 742287 B	30-04-1975

FR 3122184	A1	28-10-2022	AUCUN	

EP 0493264	A1	01-07-1992	AT E142254 T1	15-09-1996
			DE 69121870 T2	20-03-1997
			EP 0493264 A1	01-07-1992
			FR 2671097 A1	03-07-1992
			JP H0638738 A	15-02-1994

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

FR 2303676 FA 930831

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
