

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 926 820**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **08 50573**

⑤① Int Cl⁸ : **C 12 Q 1/04** (2006.01), G 01 N 21/84, 33/483 // C 12 R
1/42

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 30.01.08.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 31.07.09 Bulletin 09/31.

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

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : RAMBACH ALAIN — FR.

⑦② Inventeur(s) : RAMBACH ALAIN.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ PROCÉDE DE SELECTION DE MICROORGANISMES DANS UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE.

⑤⑦ La présente invention se rapporte à un procédé de dé-
tection de la présence d'au moins un microorganisme spé-
cifique dans un échantillon biologique, ledit procédé
comprenant les étapes de: a) la mise en culture dudit
échantillon biologique dans un milieu de culture, b) la sou-
mission dudit milieu de culture à au moins deux rayonne-
ments présentant chacun une longueur d'onde déterminée;
c) l'obtention d'au moins une image dudit milieu de culture
à l'aide d'au moins un système de lecture; et e) l'analyse de
ladite image pour détecter la présence dudit microorganis-
me spécifique dans l'échantillon biologique. L'invention se
rapporte également au dispositif permettant la mise en
oeuvre du procédé de détection selon la présente invention.

FR 2 926 820 - A1



La présente invention se rapporte à un procédé de détection de la présence de microorganismes spécifiques dans un échantillon biologique et également au dispositif permettant la mise en œuvre du procédé de détection selon la présente invention.

5 La détection rapide de microorganismes présents dans des échantillons biologiques, alimentaires ou en milieu hospitalier, est indispensable afin de définir le plus rapidement possible et avec la plus grande justesse les mesures à prendre en cas de contamination.

Il apparaît important de pouvoir définir sans erreur les contaminants, afin de
10 procéder aux traitements cliniques ou aux choix industriels adaptés.

Un système rapide et efficace se développant actuellement pour la lecture des boîtes de Pétri est l'utilisation de lecteurs à la place d'observations à l'œil nu.

Les systèmes actuels utilisent ainsi un seul éclairage dans les longueurs d'onde du visible et les observations sont réalisées à partir de la lumière réfléchie ou
15 transmise ou un seul éclairage dans les longueurs d'onde UV et les observations sont réalisées sur une image de lumière réémise. La lecture se fait alors généralement grâce à un système de lecture fixe lisant une surface (caméra, etc.) ou mobile lisant le long d'une longueur (scanner, etc.). Ces systèmes aboutissent à une seule image.

Pour autant, de tels dispositifs ne permettent pas toujours une détection
20 suffisante et appropriée, ce qui peut entraîner des erreurs dans l'identification de certains organismes.

La présente invention propose donc une solution permettant d'affiner les résultats obtenus par les procédés de l'art antérieur grâce à un procédé de détection de la présence d'au moins un microorganisme spécifique dans un échantillon
25 biologique, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) mise en culture dudit échantillon biologique dans un milieu de culture,

b) soumission dudit milieu de culture à au moins deux rayonnements présentant chacun une longueur d'onde déterminée,

c) obtention d'au moins une image dudit milieu de culture à l'aide d'au moins un système de lecture, et

5 e) analyse de ladite au moins une image pour détecter la présence de la souche de microorganismes dans l'échantillon biologique.

Par « microorganisme », on entend par exemple des bactéries ou des levures, de préférence des bactéries.

10 Par « microorganisme spécifique », on entend indifféremment un genre ou une espèce particulière ou encore un groupe de microorganismes connus pour avoir des propriétés communes, comme la résistance à un agent antimicrobien, et couramment identifiés par un terme commun.

15 À titre d'exemple de microorganisme spécifique, on pourra notamment citer des bactéries ou des levures appartenant à un genre (e.g., *Staphylococcus*) ou une espèce particulière (e.g., *Staphylococcus aureus*) ou des bactéries ou levures résistant à un antibiotique particulier, éventuellement lesdites bactéries ou levures pourront également appartenir à un genre ou à une espèce définie (e.g., MRSA)

20 Avantageusement, on entend par « microorganisme spécifique », un genre ou une espèce particulière et de manière particulièrement préférée une espèce particulière.

25 Par « échantillon biologique », on entend tout type de prélèvement microbiologique, tel que par exemple un prélèvement de matières alimentaires (produits laitiers, viande, etc.), un prélèvement d'un sol, un prélèvement sur un mammifère (peau, muqueuses, etc.), ou l'un de ses dérivés comme une préculture issue d'un tel prélèvement.

Avantageusement, ledit échantillon biologique est un échantillon biologique liquide, comme de la salive, du sang ou de l'urine, un échantillon biologique solide,

comme des fèces, ou encore un dérivé d'un échantillon biologique liquide ou solide tel qu'une pré-culture d'un tel échantillon biologique liquide ou solide.

Avantageusement encore, ledit échantillon biologique est un mélange de différents microorganismes, lesquels peuvent appartenir à des espèces voire à des genres distincts. À titre d'exemple, ledit échantillon biologique correspond au
5 mélange d'au moins deux microorganismes différents, de préférence d'au moins cinq microorganismes différents et, de manière particulièrement préférée, d'au moins dix microorganismes différents.

Par « milieu de culture », on entend un milieu permettant la croissance dudit au
10 moins un microorganisme spécifique à détecter.

Ledit milieu de culture comprend en effet les nutriments nécessaires à la croissance dudit au moins un microorganisme spécifique à détecter.

Par " nutriments nécessaires à la croissance dudit au moins un microorganisme spécifique à détecter ", on entend la composition d'un milieu de base nécessaire à
15 ladite croissance. L'homme du métier connaît parfaitement la composition de tels milieux et est à même de l'adapter si nécessaire en fonction de la spécificité de certains microorganismes ou de contraintes qui pourraient être liées à certains cas de la présente invention (transparence du milieu par exemple). Ces nutriments sont notamment choisis dans le groupe comprenant du carbone, de l'azote, du soufre, du
20 phosphore, des vitamines, des inducteurs de croissance, des hydrates de carbone, des sels (par exemple calcium, magnésium, manganèse, sodium, potassium), des complexes nutritifs (par exemple des acides aminés, du sang, du sérum, de l'albumine) ainsi que des peptones et des extraits de tissus animaux et végétaux.

De préférence, ledit milieu de culture est un milieu gélosé, lequel milieu de
25 culture est, à titre d'exemple, à base d'agar. Parmi les présentations des milieux de culture utilisables, on peut ainsi citer les boîtes de Pétri sur lesquelles se développent des microorganismes.

Les milieux de culture selon la présente invention peuvent éventuellement contenir un ou plusieurs agents antimicrobiens, en particulier un ou plusieurs antibiotiques et/ou un ou plusieurs antifongiques.

Le ou lesdits agents antimicrobiens permettent de limiter la croissance de
5 microorganismes autres que ledit au moins un microorganisme spécifique à détecter.

La quantité efficace d'agent antimicrobien à utiliser peut être déterminée simplement par l'homme du métier au regard de ses connaissances générales.

Par « mise en culture », on entend l'inoculation dudit milieu de culture par tout ou partie de l'échantillon biologique et incubation dudit milieu de culture inoculé.

10 L'homme du métier adaptera les conditions d'incubation en fonction du milieu de culture, de l'échantillon biologique et du microorganisme spécifique à détecter en fonction de ses connaissances générales.

L'étape d'incubation peut être réalisée à une température d'environ 30°C à 40°C, de préférence 37°C, et ce pendant une durée d'environ 18 à 24 h. Cependant,
15 en fonction des moyens dont il disposera, l'homme du métier pourra adapter la température et la durée de cette étape d'incubation au regard de ses connaissances générales.

On entend par « système d'éclairage » un système permettant de soumettre le milieu de culture à un rayonnement d'une longueur d'onde déterminée.

20 Le système d'éclairage peut émettre un rayonnement dans le domaine du visible ou du non visible. Aux fins de l'invention, il faut comprendre par « système d'éclairage », un système permettant l'émission d'un rayonnement d'une longueur d'onde déterminée ou pour une plage de longueurs d'onde déterminée.

Aux fins de la présente invention, ledit système d'éclairage peut être
25 uniquement constitué de la lumière environnante, comme par exemple la lumière du jour.

Selon un premier mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, lesdits au moins deux rayonnements de l'étape b) présentent une même longueur d'onde déterminée et sont opérées sous des angles différents de sorte d'obtenir une seule image.

5 Un tel mode de réalisation est illustré dans l'exemple 2.

Selon un deuxième mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, lesdits au moins deux rayonnements de l'étape b) présentent des longueurs d'onde différentes.

10 De préférence, l'étape c) permet alors d'obtenir deux images différentes dudit milieu de culture à l'aide d'au moins deux systèmes de lecture et le procédé comprend alors une étape supplémentaire d) de combinaison desdites images obtenues à l'étape c) en au moins une image artificielle combinée, et une étape e) d'analyse de l'image artificielle pour détecter la présence dudit microorganisme spécifique dans l'échantillon biologique.

15 Avantageusement, le procédé selon l'invention comprend alors les étapes de :

a) mise en culture dudit échantillon biologique dans un milieu de culture, ledit milieu de culture comprenant au moins un composé rapporteur,

20 b) soumission dudit milieu de culture aux rayonnements d'au moins deux longueurs d'onde différentes, au moins une desdites longueurs d'onde correspondant à la longueur d'onde d'absorption du au moins un composé rapporteur ou de produit libéré par le composé rapporteur présent dans ledit milieu de culture,

25 c) obtention d'au moins deux images différentes dudit milieu de culture à l'aide d'au moins deux systèmes de lecture, au moins un des deux systèmes de lecture permettant de détecter au moins un composé rapporteur ou produit libéré par le composé rapporteur,

d) combinaison desdites images obtenues à l'étape c) en au moins une image artificielle combinée,

5 e) analyse de l'image artificielle combinée obtenue à l'étape d), pour détecter la présence dudit au moins un microorganisme spécifique dans l'échantillon biologique.

Par « composé rapporteur », on entend un agent colorant, un agent chromogène ou un agent fluorogène permettant la détection dudit au moins un microorganisme spécifique.

10 À titre d'exemple d'agent colorant, on peut citer le rouge neutre précipitant présent dans le milieu « Mac Conkey Agar » ou encore le colorant vert et le colorant précipitant noir lié au caractère H₂S présent dans le milieu « Hektoen ».

De préférence les composés rapporteurs présents dans ledit échantillon sont choisis dans le groupe comprenant les agents chromogènes et les agents fluorogènes.

15 On entend par « agent chromogène » ou « agent fluorogène », un substrat d'enzyme capable de libérer respectivement un chromophore ou un fluorophore sous l'action de cette enzyme, lequel chromophore ou fluorophore sera détectable lorsqu'il sera soumis à un rayonnement de longueur d'onde appropriée.

20 Ainsi, on entend par « produit libéré par un composé rapporteur » un chromophore ou un fluorophore dans le cas d'un agent chromogène ou d'un agent fluorogène respectivement.

Ledit agent chromogène ou agent fluorogène est le substrat d'une enzyme exprimée par le microorganisme spécifique à détecter ou d'une enzyme exprimée par un microorganisme autre et susceptible d'être également présent dans l'échantillon biologique. Par exemple, en présence d'une espèce de bactérie à détecter exprimant
25 une enzyme permettant l'hydrolyse de l'agent chromogène, le chromophore est libéré et colore ledit microorganisme spécifique en une couleur donnée.

De préférence, ledit au moins un composé rapporteur est présent dans ledit milieu de culture avant son inoculation avec l'échantillon biologique. Alternativement, ledit au moins un composé rapporteur peut être introduit en même temps ou après l'inoculation dudit milieu de culture avant l'échantillon biologique ou
5 bien être présent dans l'échantillon biologique avant l'inoculation dudit milieu de culture avec ledit échantillon biologique.

Avantageusement, le milieu de culture du procédé de la présente invention peut comprendre une combinaison de plusieurs composés rapporteurs tel que, à titre d'exemple, 2, 3, 4, 5, 6 ou plus composés rapporteurs.

10 Avantageusement encore, le procédé selon l'invention comprend les étapes de :

a) mise en culture dudit échantillon biologique dans un milieu de culture, ledit milieu de culture comprenant au moins deux composés rapporteurs,

b) soumission dudit milieu de culture aux rayonnements d'au moins deux longueurs d'onde différentes, chacune desdites longueurs d'onde correspondant à la
15 longueur d'onde d'absorption d'un des au moins deux composés rapporteurs ou de produits libérés par les composés rapporteurs présents dans ledit milieu de culture,

c) obtention d'au moins deux images différentes dudit milieu de culture à l'aide d'au moins deux systèmes de lecture, chacun des deux systèmes de lecture permettant de détecter un des au moins deux composés rapporteurs ou produits
20 libérés par les composés rapporteurs,

d) combinaison desdites images obtenues à l'étape c) en au moins une image artificielle combinée,

e) analyse de l'image artificielle combinée obtenue à l'étape d), pour détecter la présence dudit au moins un microorganisme spécifique dans l'échantillon biologique.

25 Bien évidemment, la combinaison desdits composés rapporteurs est à déterminer en fonction des différents microorganismes spécifiques que l'on souhaite

détecter et plus particulièrement, des activités enzymatiques respectives desdits microorganismes.

De préférence, le milieu de culture selon la présente invention comprend au moins un agent chromogène et au moins un agent fluorogène, ladite combinaison
5 étant choisie pour permettre la détection dudit au moins un microorganisme spécifique dans l'échantillon biologique.

Dans le cadre de la présente invention, il convient de déterminer la combinaison d'agent(s) chromogène(s) et d'agent(s) fluorogène(s) appropriée pour détecter le microorganisme spécifique à détecter.

10 Le choix de la combinaison des agents chromogènes et des agents fluorogènes est primordial, mais il n'est nullement nécessaire que les enzymes agissant sur ceux-ci soient exprimées uniquement dans les microorganismes spécifiques à détecter. Ainsi, on utilisera le caractère négatif pour certaines enzymes ou/et le caractère positif pour certaines enzymes du microorganisme spécifique à détecter pour que le
15 spectre final, en terme de longueur d'onde d'absorption, permette d'identifier ledit microorganisme spécifique, selon le ou les chromophore(s) libéré(s) ou le ou les fluorophore(s) libéré(s).

Selon un troisième mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, ledit au moins un agent chromogène utilisé est choisi parmi les substrats des enzymes liés
20 au métabolisme des sucres et, notamment, dans le groupe constitué des substrats de la β -glucosidase, des substrats de la β -galactosidase, des substrats de la β -glucuronisase et des substrats de la phosphatase.

A titre d'agent chromogène utilisable pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention, on peut notamment citer les composés permettant la production
25 d'hydrogène sulfuré (H_2S), qui donnent une coloration noire sous éclairage dans le domaine du visible.

De préférence, le chromophore est choisi dans le groupe constitué des dérivés indoxyle, halogéno-indoxyle (bromo-indoxyle, chloro-indoxyle, fluoro-indoxyle,

iodo-indoxyle, dichloro-indoxyle, chloro-bromo- indoxyle, tri-chloro-indoxyle), méthyl-indoxyle, et hydroxy-quinoline, en particulier parmi les dérivés suivants : 6-chloro-indoxyle, 5-bromo-indoxyle, 3-bromo- indoxyle, 6-fluoro-indoxyle, 5-iodo-indoxyle, 4,6-dichloro-indoxyle, 6,7-dichloro- indoxyle, 5-bromo-4-chloro-indoxyle, 5-bromo-6-chloro-indoxyle, 4,6, 7-trichloro- indoxyle, N-méthyl-indoxyle ou 8-hydroxy-quinoline.

Selon un quatrième mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, ledit au moins un agent fluorogène utilisé est choisi parmi les substrats des enzymes liés au métabolisme des sucres et, notamment, dans le groupe constitué des substrats de la β -glucosidase, des substrats de la β -galactosidase, des substrats de la β -glucuronisase et des substrats de la phosphatase.

A titre d'agent fluorogène, on peut notamment citer le 4-méthyl umbelliféryl, par exemple lié à un glucose (Méthyl-umbellyferyl- β -glucoside), ou des dérivés ELF® tels le ELF®-phosphate (MOLECULAR PROBES INC et BIOSYNTH) libérant un fluorophore précipitant tel que décrit par exemple dans la demande de brevet EP0949266.

Selon un cinquième mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, le milieu de culture de l'étape a) comprend un agent chromogène permettant la libération d'H₂S et un agent fluorogène permettant la libération de méthyl-umbellyferyl- β -glucoside.

L'hydrogène sulfuré libéré est alors détecté dans le visible et le méthyl-umbellyferyl- β -glucoside libéré est détecté dans une longueur d'onde du domaine des ultraviolets.

Ce mode de réalisation préféré permet la détection des souches *Salmonella* d'un échantillon biologique comprenant par exemple les bactéries *Salmonella*, *Citrobacter freundii* et *Escherichia coli*. Un tel mode de réalisation est illustré dans l'exemple 1.

De préférence, la soumission du milieu de culture aux rayonnements d'au moins deux longueurs d'onde différentes est réalisée par au moins deux systèmes d'éclairage.

De préférence, le système d'éclairage permet de soumettre le milieu de culture
5 au rayonnement d'une longueur d'onde déterminée pour la détection d'un composé rapporteur ou d'un produit libéré par un composé rapporteur.

De préférence, le système d'éclairage sera choisi pour émettre à la longueur d'onde d'absorption d'un composé rapporteur ou d'un produit libéré par un composé rapporteur présent dans ledit milieu de culture.

10 Dans un sixième mode de réalisation préférée du procédé selon l'invention, le nombre de systèmes d'éclairage sera fonction des types de composés rapporteurs présents dans le milieu de culture (agents chromogènes et/ou agents fluorogènes). Avantagusement, le nombre de systèmes d'éclairage sera égal au nombre de types de composés rapporteurs présents dans le milieu de culture.

15 On admettra ici que le spectre du visible s'étend de 400 à 800nm, celui des infrarouges de 780nm à 1000μm et celui des ultraviolets de 10 à 400nm.

Ledit système d'éclairage peut en outre permettre de transmettre une lumière réfléchie ou transmise.

Ledit système d'éclairage peut également émettre un rayonnement en continu
20 ou en discontinu, par exemple de l'ordre du dixième de seconde. Plusieurs systèmes d'éclairage peuvent, par exemple, éclairer de manière alternative dans le domaine du visible et du non visible et créer, dans certains cas, une seule image résultante visible à l'œil nu.

De préférence, lesdits au moins deux rayonnements émis par lesdits systèmes
25 d'éclairages ont des longueurs d'onde très différentes.

À titre d'exemple, le procédé de détection selon la présente invention peut utiliser un système d'éclairage émettant dans le domaine du visible et un système

d'éclairage dans le domaine des ultraviolets, les deux systèmes fonctionnant de manière alternative.

Le système d'éclairage peut par exemple être constitué de diodes électroluminescentes (LED).

- 5 Par « image » obtenue par le système de lecture, on entend par exemple une image optique ou une image numérique ou encore une image obtenue sur un support papier ou plastique. Préférentiellement, il s'agit d'une image numérique.

On entend par « système de lecture » un système permettant l'obtention d'au moins une image du milieu de culture.

- 10 Le système de lecture peut être fixe et lire une surface déterminée (par exemple une caméra), ou mobile, la lecture se faisant alors par balayage le long d'une longueur déterminée (par exemple un scanner).

- De préférence, le système de lecture permet de détecter un composé rapporteur ou produit libéré par un composé rapporteur dans ledit milieu de culture lorsque celui-ci est soumis au rayonnement du système d'éclairage à une longueur d'onde appropriée.
- 15

- De préférence, le système de lecture permet de détecter une longueur d'onde d'émission d'un composé rapporteur ou d'un composé libéré par un composé rapporteur, par exemple dans des longueurs d'onde du visible, des ultraviolets ou des infrarouges.
- 20

L'homme du métier peut déterminer facilement le système de lecture approprié pour détecter une longueur d'onde donnée.

Ainsi, avantageusement, l'utilisation d'au moins deux systèmes de lecture permet l'obtention simultanée d'au moins deux images qui peuvent être combinées.

- 25 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le système de lecture peut comprendre au moins un filtre. Aux fins de l'invention, il faut comprendre que

le système de lecture recouvert d'un filtre est différent du système de lecture sans filtre. Si des images sont obtenues avec et sans filtre, il faut alors comprendre que le système d'obtention d'images d'un échantillon comprend deux systèmes de lecture.

De préférence, le nombre de systèmes de lecture de la présente invention sera
5 fonction du nombre de types de composés rapporteurs présents dans le milieu de culture. Avantageusement, le nombre de systèmes de lecture sera égal au nombre de types de composés rapporteurs présents dans le milieu de culture.

La combinaison des images pour l'obtention d'une image artificielle combinée,
10 telle que décrite à l'étape d), peut alors être réalisée par un système de combinaison d'images.

On entend par « image artificielle combinée », la superposition d'au moins deux images différentes obtenues à l'étape c). De préférence, l'image artificielle combinée selon la présente invention est une image en deux dimensions.

L'image artificielle combinée peut être par exemple une image optique ou une
15 image numérique ou une image obtenue sur un support papier ou plastique. Préférentiellement, il s'agit d'une image numérique.

On entend par « système de combinaison d'images » un système qui reçoit différentes images et est alors capable de combiner ces images, par exemple par superposition, pour l'obtention d'au moins une image artificielle combinée qui
20 pourra alors servir de support pour une analyse ultérieure.

Avantageusement, ledit système de combinaison d'images est un logiciel de combinaison d'images, lesquels sont bien connus de l'homme du métier, ou éventuellement une superposition manuelle d'au moins deux images. De préférence, ledit système de combinaison d'images est un logiciel de combinaison d'images.

25 L'analyse de l'image artificielle combinée telle que décrite à l'étape e) peut être réalisée par simple observation par un homme du métier ou traitée informatiquement.

De préférence, l'analyse de l'image artificielle combinée de l'étape e) est réalisée par traitement informatique.

De préférence, le procédé de détection selon la présente invention est un procédé de détection directe.

5 Par « procédé de détection directe », on entend un procédé qui ne comprend pas d'étape préalable d'isolement des différents microorganismes présents dans l'échantillon biologique. Eventuellement, ledit procédé de détection directe peut comprendre une étape d'enrichissement, par exemple en bouillon sélectif assimilable à une étape de préculture dudit échantillon biologique.

10 Avantageusement, la combinaison de l'étape d) est réalisée immédiatement après ou simultanément à l'étape c).

Le procédé de détection proposé par la présente invention est essentiellement un test qualitatif, c'est-à-dire un test permettant de révéler la présence ou l'absence d'un microorganisme spécifique dans l'échantillon biologique. Toutefois, rien ne
15 s'oppose à ce que le procédé de l'invention soit appliqué à des mesures quantitatives par la méthode des dilutions successives et étalement sur milieux gélosés ou modifié en un test semi-quantitatif conformément à la méthode MPN (Most Probable Number) par exemple.

Le procédé de l'invention est avantageusement mis en œuvre de façon semi-
20 automatisée voire totalement automatisée.

Un autre aspect de l'invention concerne un dispositif pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention, comprenant :

- au moins deux systèmes d'éclairage, chaque système d'éclairage émettant un rayonnement d'une longueur d'onde déterminée;
- 25 - au moins un système de lecture pour obtenir au moins une image du milieu de culture.

De préférence, le dispositif selon l'invention comprend :

- au moins deux systèmes d'éclairage, chaque système d'éclairage émettant un rayonnement d'une longueur d'onde déterminée;

- au moins deux systèmes de lecture pour l'obtention d'au moins deux images
5 du milieu de culture ;

- au moins un système de combinaison des images obtenues par les au moins deux systèmes de lecture pour l'obtention d'une image artificielle combinée.

Avantageusement, ledit dispositif pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention, comprend :

- 10 - au moins deux systèmes d'éclairage, au moins un desdits systèmes d'éclairage émettant un rayonnement d'une longueur d'onde correspondant à une longueur d'onde d'absorption d'un composé rapporteur ou d'un composé libéré par un composé rapporteur présent dans le milieu de culture tel que décrit précédemment;

- au moins deux systèmes de lecture pour l'obtention d'au moins deux images
15 du milieu de culture, au moins un desdits systèmes de lecture permettant la détection d'un composé rapporteur ou d'un produit libéré par le composé rapporteur;

- au moins un système de combinaison des images obtenues par les au moins deux systèmes de lecture pour l'obtention d'une image artificielle combinée.

De manière préférée, ledit dispositif pour la mise en œuvre du procédé selon la
20 présente invention, comprend :

- au moins deux systèmes d'éclairage, chaque système d'éclairage émettant un rayonnement d'une longueur d'onde correspondant à une longueur d'onde d'absorption d'un composé rapporteur ou d'un composé libéré par un composé rapporteur présent dans ledit milieu de culture;

- au moins deux systèmes de lecture, chaque système de lecture permettant la détection d'un composé rapporteur ou d'un produit libéré par le composé rapporteur, pour l'obtention d'au moins deux images du milieu de culture ;

5 - au moins un système de combinaison des images obtenues par les au moins deux systèmes de lecture pour l'obtention d'une image artificielle combinée.

Ledit dispositif peut également comprendre un milieu de culture pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention, comprenant éventuellement au moins un ou plusieurs composés rapporteurs, de préférence deux composés rapporteurs. Ledit milieu de culture et lesdits composés rapporteurs sont tels que
10 définis précédemment.

Finalement, ledit dispositif pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention peut être sous la commande d'un ordinateur.

Les exemples et les figures qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

15 LEGENDES DES FIGURES

La figure 1 est une représentation schématique d'images d'un milieu de culture selon la présente invention.

Les images 1 et 2 correspondent à des images obtenues à l'étape c).

L'image 3 correspond à une image artificielle combinée des images 1 et 2.

20 La figure 2 est une représentation schématique d'un dispositif de détection selon la présente invention.

EXEMPLES :

Exemple 1 : Détection de souches de *Salmonella*, *Citrobacter freundii* et *Escherichia coli* dans un mélange

Un mélange contenant des souches de *Salmonella*, *Citrobacter freundii* et *Escherichia coli* est mis en culture sur un milieu de croissance permettant la
5 production d'H₂S (hydrogène sulfuré) et du méthyl-umbellyferyl-β-glucoside.

Le caractère de la production d'H₂S permet de colorer en noir les bactéries positives.

Le méthyl-umbellyferyl-β-glucoside permet l'observation d'une fluorescence pour les bactéries positives sous éclairage UV.

10 Les résultats du tableau 1 ci-après et de la figure 1 montrent que la combinaison de l'image obtenue sous éclairage visible et de l'image obtenue sous éclairage aux ultraviolets permet de distinguer clairement la souche *Salmonella* pour laquelle une coloration artificielle Rouge intense est obtenue, des souches *Citrobacter freundii* et *Escherichia coli*, pour lesquelles des colorations artificielles Bleu pâle et Gris sont
15 respectivement obtenues.

Tableau 1

	Milieu de croissance incluant le caractère de la production d'H ₂ S (coloré en noir pour les bactéries positives) et incluant du Methyl umbellyferyl beta Glucoside (donnant de la fluorescence pour les bactéries positives)		
	<i>Salmonella</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>E.coli</i>
Noircissement sous Eclairage visible	+	+	-
Florescence sous Eclairage UV	-	+	-
Image artificielle combinée (couleurs au choix du traitement informatique)	Rouge intense	Bleu pâle	Gris

Exemple 2 : Détection d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis* et *Enterobacter cloacae* dans un mélange.

Un mélange contenant des souches de *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis* et *Enterobacter cloacae* est mis en culture sur
5 un milieu de croissance CHROMagar Orientation (Société CHROMagar, Paris, France).

On obtient une coloration en rouge ou bleu des colonies de ces quatre espèces sous éclairage perpendiculaire avec de la lumière blanche.

Une lecture de l'opacité des colonies est faite séparément à partir du traitement
10 de l'image obtenue sous éclairage angulaire avec de la lumière blanche.

Les résultats du tableau 2 ci-après montrent que la combinaison de l'image obtenue sous éclairage perpendiculaire et de l'image obtenue sous éclairage angulaire permet de distinguer les quatre souches à l'aide des quatre couleurs artificielles Rouge, Gris, Jaune et Bleu respectivement obtenues.

15

Tableau 2

	Milieu de croissance CHROMagar Orientation (société CHROMagar, Paris, France) colorant les colonies de bactéries différenciellement suivant les espèces et donnant un aspect opaque aux colonies de bactéries à gram positif			
	<i>E.coli</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
Coloration en rouge ou bleu	Rouge	Rouge	Bleu	Bleu
Aspect opaque sous éclairage angulaire	-	+	+	-
Image artificielle combinée (couleurs au choix du traitement informatique)	Rouge	Gris	Jaune	Bleu

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection de la présence d'au moins un microorganisme spécifique dans un échantillon biologique, ledit procédé comprenant les étapes de :
 - 5 a) mise en culture dudit échantillon biologique dans un milieu de culture,
 - b) soumission dudit milieu de culture à au moins deux rayonnements présentant chacun une longueur d'onde donnée,
 - c) obtention d'au moins une image dudit milieu de culture à l'aide d'au moins un système de lecture, et
 - 10 e) analyse de ladite au moins une image, pour détecter la présence dudit microorganisme spécifique dans l'échantillon biologique.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdits au moins deux rayonnement de l'étape b) présentent des longueurs d'onde différentes.
 - 15
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'étape c) permet alors d'obtenir deux images différentes dudit milieu de culture à l'aide d'au moins deux systèmes de lecture et en ce que le procédé comprend alors une étape supplémentaire
 - d) de combinaison desdites images obtenues à l'étape c) en au moins une image artificielle combinée, et une étape e) d'analyse de ladite image artificielle pour
 - 20 détecter la présence dudit microorganisme spécifique dans l'échantillon biologique.
4. Procédé de détection selon la revendication 3, comprenant les étapes de :

- a) mise en culture dudit échantillon biologique dans un milieu de culture, ledit milieu de culture comprenant au moins un composé rapporteur,
- b) soumission dudit milieu de culture aux rayonnements d'au moins deux longueurs d'onde différentes, au moins une desdites longueurs d'onde correspondant à la longueur d'onde d'absorption du au moins un composé rapporteur ou de produit libéré par le composé rapporteur présent dans ledit milieu de culture,
- c) obtention d'au moins deux images différentes dudit milieu de culture à l'aide d'au moins deux systèmes de lecture, au moins un des deux systèmes de lecture permettant de détecter au moins un composé rapporteur ou produit libéré par le composé rapporteur,
- d) combinaison desdites images obtenues à l'étape c) en au moins une image artificielle combinée, et
- e) analyse de l'image artificielle combinée obtenue à l'étape d), pour détecter la présence dudit microorganisme spécifique dans l'échantillon biologique.
- 5.
- Procédé de détection selon la revendication 3 ou 4, comprenant les étapes de :
- a) mise en culture dudit échantillon biologique dans un milieu de culture, ledit milieu de culture comprenant au moins deux composés rapporteurs ;
- b) soumission dudit milieu de culture aux rayonnements d'au moins deux longueurs d'onde différentes, chacune desdites longueurs d'onde correspondant à la longueur d'onde d'absorption d'un des au moins deux composés rapporteurs ou de produits libérés par les composés rapporteurs présents dans ledit milieu de culture ;
- c) obtention d'au moins deux images différentes dudit milieu de culture à l'aide d'au moins deux systèmes de lecture, chacun des deux systèmes de lecture

permettant de détecter un des au moins deux composés rapporteurs ou produits libérés par les composés rapporteurs ;

d) combinaison desdites images obtenues à l'étape c) en au moins une image artificielle combinée ; et

5 e) analyse de l'image artificielle combinée obtenue à l'étape d), pour détecter la présence dudit microorganisme spécifique dans l'échantillon biologique.

6. Procédé de détection selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le microorganisme spécifique à détecter est une bactérie.

10

7. Procédé de détection selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, dans lequel ledit au moins un composé rapporteur présent dans ledit milieu de culture est choisi dans le groupe comprenant les agents chromogènes et les agents fluorogènes.

15 8. Procédé de détection selon la revendication 7, dans lequel ledit milieu de culture comprend au moins un agent chromogène et au moins un agent fluorogène.

9. Procédé de détection selon la revendication 8, dans lequel ledit agent chromogène permet la libération d'H₂S et ledit agent fluorogène permet la libération
20 de méthyl-umbellyferyl- β -glucoside.

10. Procédé de détection selon la revendication 9 pour la détection de bactéries du genre *Salmonella*.

11. Procédé de détection selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le milieu de culture comprend en outre au moins un antibiotique.
12. Procédé de détection selon l'une quelconque des revendications précédentes,
5 dans lequel le milieu de culture est un milieu gélosé.
13. Dispositif pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, comprenant :
- 10 - au moins deux systèmes d'éclairage, chaque système d'éclairage émettant un rayonnement d'une longueur d'onde déterminée;
- au moins un système de lecture pour obtenir au moins une image du milieu de culture.
14. Dispositif selon la revendication 13, comprenant :
- 15 - au moins deux systèmes d'éclairage, chaque système d'éclairage émettant un rayonnement d'une longueur d'onde déterminée;
- au moins deux systèmes de lecture pour l'obtention d'au moins deux images du milieu de culture tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ;
- 20 - au moins un système de combinaison des images obtenues par les au moins deux systèmes de lecture pour l'obtention d'une image artificielle combinée.
15. Dispositif selon la revendication 14, comprenant :

- au moins deux systèmes d'éclairage, au moins un desdits systèmes d'éclairage émettant un rayonnement d'une longueur d'onde correspondant à une longueur d'onde d'absorption d'un composé rapporteur ou d'un composé libéré par un composé rapporteur présent dans ledit milieu de culture;
- 5
- au moins deux systèmes de lecture pour l'obtention d'au moins deux images du milieu de culture, au moins un desdits systèmes de lecture permettant la détection d'un composé rapporteur ou d'un produit libéré par le composé rapporteur;
 - au moins un système de combinaison des images obtenues par les au moins deux systèmes de lecture pour l'obtention d'une image artificielle combinée.
- 10
16. Dispositif selon la revendication 14 ou 15, comprenant :
- au moins deux systèmes d'éclairage, chaque système d'éclairage émettant un rayonnement d'une longueur d'onde correspondant à une longueur d'onde d'absorption d'un composé rapporteur ou d'un composé libéré par un composé
- 15
- rapporteur présent dans ledit milieu de culture;
 - au moins deux systèmes de lecture, chaque système de lecture permettant la détection d'un composé rapporteur ou d'un produit libéré par le composé rapporteur, pour l'obtention d'au moins deux images du milieu de culture ;
 - au moins un système de combinaison des images obtenues par les au moins deux
- 20
- systèmes de lecture pour l'obtention d'une image artificielle combinée.

Mélange de *Salmonella*, *Citrobacter freundii* et *Escherichia coli*
sur milieu gélosé en boîtes de Pétri

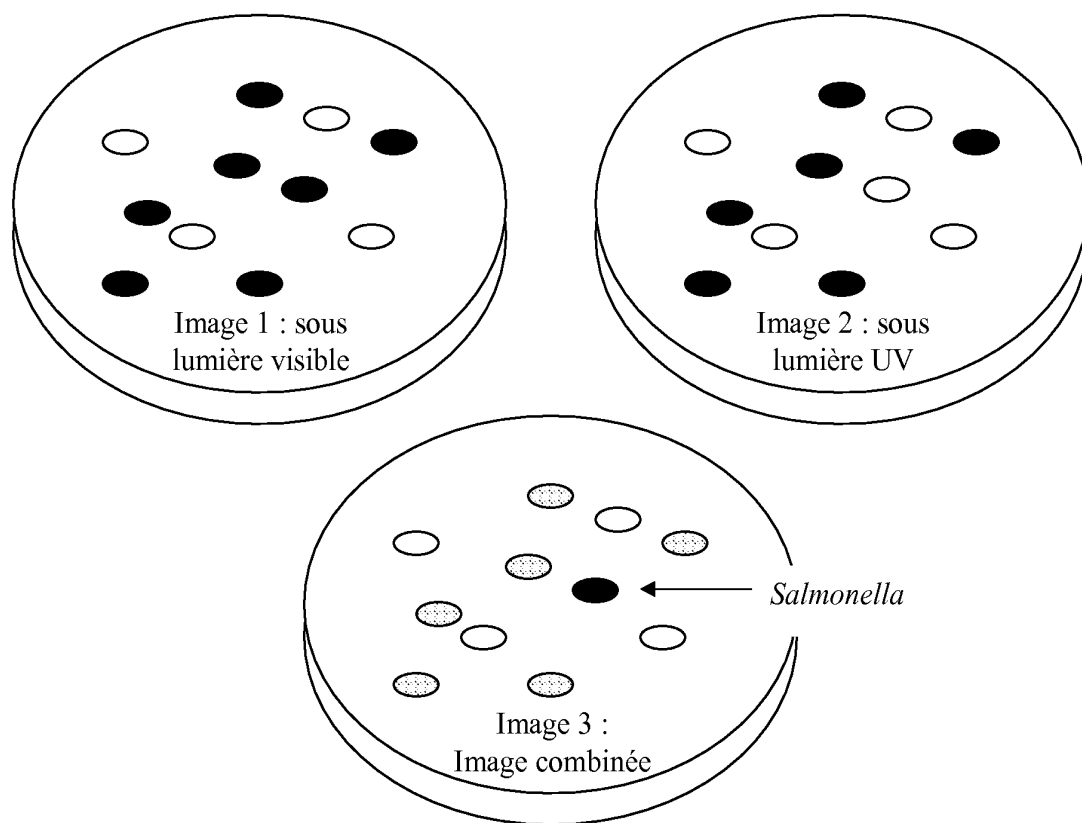


Figure 1

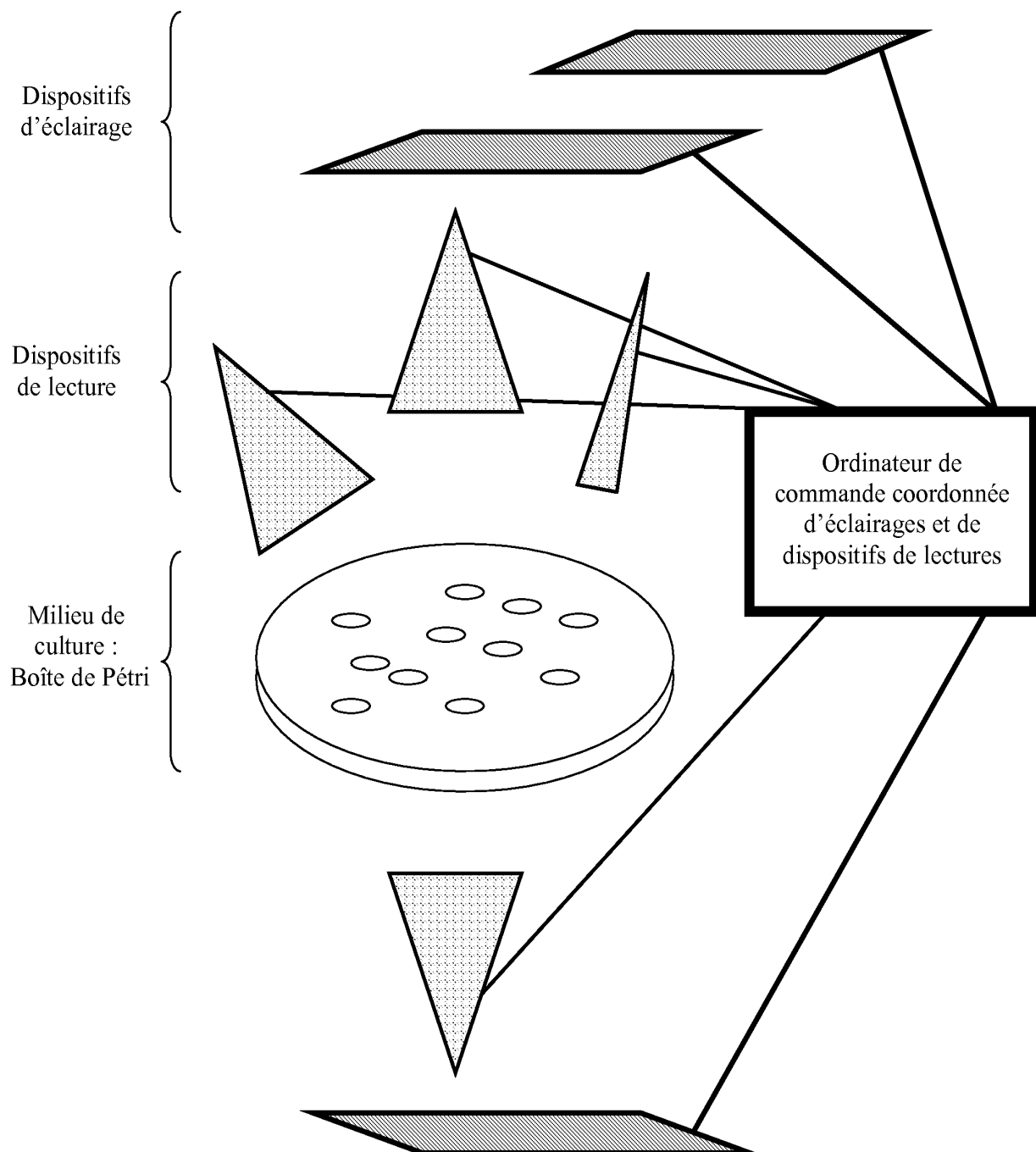


Figure 2

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement
national

FA 705038
FR 0850573

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	US 5 914 245 A (BYLINA E.J. [US] ET AL.) 22 juin 1999 (1999-06-22) * abrégé * * colonne 2, ligne 8 - ligne 67 * * colonne 4, ligne 45 - ligne 51 * * colonne 6, ligne 58 - colonne 8, ligne 48 * * colonne 12, ligne 15 - ligne 33 * * exemple 9 * * revendications 1-50 *	1-7, 13-16	C12Q1/04 G01N21/84 G01N33/483 C12R1/42
X	US 2005/202523 A1 (SHAW E. [IL] ET AL.) 15 septembre 2005 (2005-09-15) * abrégé * * alinéas [0015], [0016], [0025] - [0027], [0048] * * revendications 15-30 *	1-8,11, 13-16	
X	US 2004/243318 A1 (OGAWA A. [JP] ET AL.) 2 décembre 2004 (2004-12-02) * abrégé * * alinéas [0011], [0012], [0099] * * revendications 1-37 *	1-7, 13-16	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	RAMBACH A.: "New plate medium for facilitated differentiation of Salmonella spp. from Proteus spp. and other enteric bacteria" APPL. ENVIRON. MICROBIOL., vol. 56, no. 1, 1 janvier 1990 (1990-01-01), pages 301-303, XP009007598 * le document en entier *	1-16	C12M G01B C12Q
A	WO 2006/089889 A (RAMBACH A. [FR]) 31 août 2006 (2006-08-31) * le document en entier *	1-16	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 septembre 2008		Giry, Murielle	
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			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 705038
FR 0850573

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	GAILLOT O. ET AL.: "Comparison of CHROMagar Salmonella medium and Hektoen enteric agar for isolation of Salmonellae from stool samples" J. CLIN. MICROBIOL., vol. 37, no. 3, mars 1999 (1999-03), pages 762-765, XP002495263 * le document en entier * -----	1-16	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 septembre 2008		Giry, Murielle	
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 0850573 FA 705038

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 **10-09-2008**

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
US 5914245 A	22-06-1999	WO 0078997 A1	28-12-2000
US 2005202523 A1	15-09-2005	AT 383437 T	15-01-2008
		AU 2398502 A	21-05-2002
		AU 2002223985 B2	27-01-2005
		CA 2428074 A1	16-05-2002
		CN 1481440 A	10-03-2004
		DK 1337658 T3	19-05-2008
		EP 1337658 A2	27-08-2003
		ES 2298292 T3	16-05-2008
		HK 1063337 A1	09-05-2008
		WO 0238724 A2	16-05-2002
		JP 3732180 B2	05-01-2006
		JP 2004513628 T	13-05-2004
US 2004243318 A1	02-12-2004	CA 2454294 A1	30-01-2003
		CN 1537171 A	13-10-2004
		EP 1418238 A1	12-05-2004
		WO 03008634 A1	30-01-2003
		JP 4029983 B2	09-01-2008
WO 2006089889 A	31-08-2006	EP 1851326 A1	07-11-2007
		FR 2882370 A1	25-08-2006
		JP 2008530993 T	14-08-2008
		US 2008160555 A1	03-07-2008