

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 octobre 2021 (14.10.2021)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2021/205330 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/04 (2006.01) C12Q 1/18 (2006.01)
C12Q 1/06 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/IB2021/052832

(22) Date de dépôt international :
06 avril 2021 (06.04.2021)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
2003429 06 avril 2020 (06.04.2020) FR

(71) Déposant : UNIVERSITÉ DE LIMOGES [FR/FR] ; Hôtel de l'Université, 33, rue François Mitterrand, 87032 Limoges Cedex (FR).

(72) Inventeurs : BATTU, Serge ; 35, rue du Consulat, 87420 Saint-Victorien (FR). BÉGAUD, Gaëlle ; 26, rue Georges Bizet, 87350 Panazol (FR). DELABASSÉE, Sylvie ; 10, rue de Bellevue, 87700 Aix-sur-Vienne (FR). BARRAUD, Olivier ; 80, rue Armand Barbès, 87100 Limoges (FR). DUVAL, Raphaël ; 7, rue du baron Nicolas Charles de Vincent, 57170 Bioncourt (FR). CARDOT, Philippe ; 17, rue Charles Michels, 87000 Limoges (FR).

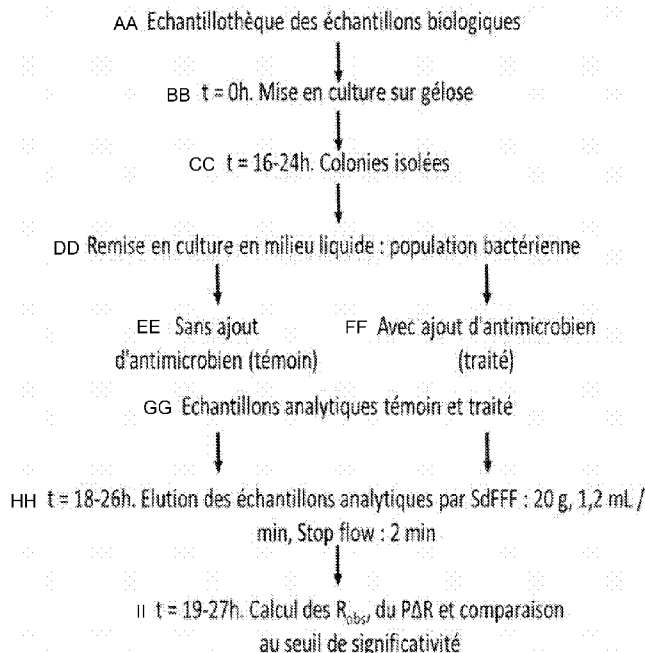
(74) Mandataire : CABINET CHAILLOT ; 16/20 avenue de l'Agent Sarre, B.P. 74, 92703 Colombes Cedex (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,

(54) Title: RESEARCH INTO ANTIMICROBIAL RESISTANCE BY THE FIELD FLOW FRACTIONATION TECHNIQUE

(54) Titre : RECHERCHE DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS PAR LA METHODE DE FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX-FORCE

[Fig. 4]



AA Library of biological samples
BB t = 0 h. Culturing on agar
CC t = 16-24 h. Isolated colonies
DD Reculturing in liquid medium: bacterial population
EE No antimicrobial agent added (control)
FF Antimicrobial agent added (treated)
GG Analytical samples, control and treated
HH t = 18-26 h. Elution of analytical samples by SdFFF: 20 g, 1.2 mL/min, Stop flow: 2 min
II t = 19-27 h. Calculation of R_{obs} values and PDELTA and comparison with significance threshold

(57) Abstract: The present invention concerns a method for determining the resistance of a microorganism to at least one antimicrobial agent using a field flow fractionation apparatus. It also embraces the use of a field flow fractionation apparatus in accordance with said method, and a kit for determining the resistance of a microorganism to at least one antimicrobial agent by a field flow fractionation technique.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien à l'aide d'un dispositif de fractionnement par couplage flux-force. Elle comprend également l'utilisation d'un dispositif de fractionnement par couplage flux-force selon ledit procédé, ainsi qu'un kit pour la détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien par une technique de fractionnement par couplage flux-force.

[Suite sur la page suivante]

WO 2021/205330 A1

CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

- *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17(iv))*

Publiée:

- *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*
- *en noir et blanc ; la demande internationale telle que déposée était en couleur ou en échelle de gris et est disponible sur PATENTSCOPE pour téléchargement.*

Description

Titre de l'invention : Recherche de résistance aux antimicrobiens par la méthode de Fractionnement par Couplage Flux-Force

- [0001] L'invention concerne le domaine du diagnostic biologique, en particulier le diagnostic biomédical dans le cadre de la recherche de la résistance aux agents antimicrobiens.
- [0002] Diverses méthodes sont actuellement mises en œuvre pour la détermination du niveau de sensibilité ou de résistance de micro-organismes isolés et identifiés à partir de prélèvements de différentes natures (urines, selles, expectorations, pus, liquides céphalo-rachidiens, sang, etc...). La méthode de référence est la dilution en milieu liquide, mais il existe d'autres méthodes plus ou moins automatisées et utilisées dans les laboratoires de biologie médicale, telles que la microdilution en milieu liquide, la diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) ou encore la technique des « E-tests ». Pour les deux dernières méthodes citées, les contraintes de temps liées aux vitesses de croissance des bactéries font qu'un antibiogramme réalisé un jour donné ne voit son résultat rendu que le lendemain après 16 à 24 heures d'incubation. Pour l'antibiogramme par microdilution en milieu liquide, il faut tout de même compter une dizaine d'heures en moyenne avant l'obtention du résultat.
- [0003] Ces méthodes de détermination des profils de sensibilité/résistance aux antimicrobiens constituent des outils diagnostics essentiels pour la prise en charge des patients en médecine humaine ou vétérinaire. En effet, la prescription de molécules ciblées permet un traitement efficace de l'infection tout en limitant l'émergence de souches résistantes liée au mésusage des antimicrobiens et notamment des antibiotiques. Les prescriptions abusives et inutiles, les prescriptions de molécules insuffisamment efficaces, les mauvaises observances des patients, les automédications contribuent toutes à l'émergence de souches résistantes.
- [0004] Il devient primordial dans le contexte actuel de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, de l'émergence de nouvelles résistances, couplées à un nombre très réduit de nouveau antimicrobiens mis sur le marché et au manque d'alternatives thérapeutiques (peptides antimicrobiens, anticorps, phages, phytothérapie, quorum quenching, nano-particules...) de proposer une nouvelle méthode sensible, rapide et efficace de détermination de la résistance de micro-organismes aux antimicrobiens.
- [0005] La problématique actuelle, qui est à l'échelle mondiale, concerne principalement les bactéries à Gram négatif telles que les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* ou encore *Acinetobacter baumannii*, même si des problématiques demeurent pour ce qui concerne certaines bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus*, *Enterococcus*, etc.

- [0006] Actuellement, les méthodes mises en jeu dans la réalisation des antibiogrammes permettent une réponse fiable en moyenne 36-48 heures post-prélèvement. Ce délai impose au clinicien de choisir de façon transitoire une antibiothérapie dite probabiliste, à l'aide d'un antibiotique généralement à large spectre, selon des protocoles préétablis. Ce délai est un élément crucial dans le cadre de pathologies aiguës à prise en charge hospitalière, et peut engager le pronostic vital du patient. Le développement de nouvelles méthodes de réalisation des antibiogrammes visant à réduire le délai de 12-24 heures existant entre l'isolement/l'identification de la bactérie et le rendu du test de l'antibiogramme devient un enjeu majeur de santé publique.
- [0007] D'un point de vue économique, avec les techniques actuelles, beaucoup de consommables sont utilisés : cartes avec des antibiotiques lyophilisés, disques d'antibiotiques, boîtes de Pétri, et mettent en jeu une grande quantité de plastique et une gestion complexe des réactifs (date de péremption des antibiotiques, boîtes de Pétri, gestion des déchets, réactovigilance...). L'invention proposée ici ne fait appel qu'à peu de consommables livrables sous forme d'un kit.
- [0008] C'est donc dans un contexte d'optimisation de l'efficacité et de la précocité de l'antibiothérapie que la recherche de méthodes réduisant le temps d'analyse de la souche pathogène devient primordiale. Par le développement conjoint de prototypes et de méthodologies de fractionnement par couplage flux-force de sédimentation (SdFFF) adaptés au tri cellulaire bactérien, et par l'établissement d'une preuve de concept robuste, il est désormais possible aux présents inventeurs de proposer un nouveau procédé d'antibiogramme permettant de réduire à 24 heures maximum le rendu de résultat au clinicien après la prise en charge du patient. Cette réduction du temps d'obtention du résultat d'antibiogramme permet d'envisager une meilleure efficacité thérapeutique, une prise en charge optimisée des urgences ainsi qu'une réduction du coût de prise en charge du patient.
- [0009] Le domaine d'application de ce procédé est très vaste et concerne aussi bien le diagnostic médical que vétérinaire, et s'adresse à tous les laboratoires d'analyses biologiques publics et privés. Aussi, la présente invention, au-delà de son utilité dans le cadre du diagnostic biomédical, peut être utilisée en industrie, dans les laboratoires de recherche ou les organismes certificateurs lors des phases de recherche et développement de nouvelles solutions thérapeutiques en mettant en évidence leurs potentiels antibactériens.
- [0010] BREVE DESCRIPTION DE L'INVENTION
- [0011] Les présents inventeurs proposent d'utiliser la technique de Fractionnement par couplage Flux-Force (Field Flow Fractionation ou FFF) développée dans la fin des années 1960 par J.C. Giddings. Cette méthode est souvent présentée comme l'une des méthodes séparatives les plus polyvalentes. En effet, la grande variété des champs uti-

lisables (hydrodynamique, gravité, électrique, magnétique, ...), de configurations instrumentales, de modes d'élution, permettent d'envisager une infinité de conditions expérimentales à mettre en œuvre pour le tri, la séparation et la caractérisation de polymères, de poudres, d'émulsions, de colloïdes, de nanoparticules ou de bioparticules : macromolécules, virus, organites et cellules dont la taille varie entre 10 nm et 100 μm .

[0012] L'une de ces méthodes, la SdFFF utilise un champ multigravitationnel et reste une des méthodes de FFF les plus utilisées. Cette méthode présente une importante sensibilité en termes de changement de taille, de densité, de forme ou de déformabilité des objets analysés, et permet un enregistrement précoce des modifications métaboliques dans la population cellulaire sans préparation spécifique de l'échantillon analysé. Il est ainsi possible, par la simple comparaison des profils d'élution ou fractogrammes, de mettre en évidence une modification métabolique entre un échantillon analytique témoin non traité et un échantillon analytique soumis à l'événement biologique. Cette fonction de suivi ou monitoring s'est révélée intéressante dans le domaine de l'oncologie en démontrant de façon précoce et sensible l'induction de phénomènes majeurs tels que l'apoptose, la différenciation, l'autophagie, l'hypoxie, l'efficacité de transformation par vecteur de modulation d'expression génique..., laissant envisager son potentiel en tant qu'outil de criblage pharmacologique.

[0013] C'est ainsi que les inventeurs ont réalisé les travaux de recherche qui ont abouti à la première mise en évidence de l'objet de l'invention dans le domaine du diagnostic en microbiologie.

[0014]

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

[0015]

[0016] La présente invention a ainsi pour objet un procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien, caractérisé par le fait que le procédé comprend les étapes consistant à :

- [0017] – se procurer au moins une population microbienne de microorganismes à partir d'un échantillon biologique ;
- traiter une partie de chaque population microbienne avec l'antimicrobien, l'autre partie n'étant pas traitée avec ledit antimicrobien ;
- incuber ladite ou lesdites populations microbiennes avec ou sans antimicrobien, obtenant ainsi respectivement le ou les échantillons analytiques traités et le ou les échantillons analytiques témoins ;
- éluer le ou les échantillons analytiques de l'étape précédente dans un dispositif de fractionnement par couplage flux-force ;

- obtenir les profils d'élution du ou des échantillons analytiques traités et du ou des échantillons analytiques témoins pour chaque population microbienne ;
 - et quantifier la variation des signaux contenus dans les profils d'élution du ou des échantillons analytiques témoins et du ou des échantillons analytiques traités par l'antimicrobien et la comparer à un seuil de significativité ;
- [0018] dans lequel, lorsque la variation des signaux contenus dans le ou les profils d'élution du ou des échantillons analytiques traités par l'antimicrobien par rapport au profil d'élution du ou des échantillons analytiques témoins est supérieure au seuil de significativité, alors le microorganisme de ladite population microbienne est considéré comme sensible à l'antimicrobien.
- [0019] En outre, le microorganisme constitutif de la population microbienne peut être l'un quelconque choisi parmi les bactéries, les champignons, les levures, les protozoaires.
- [0020] Etant donné son caractère phénotypique, l'invention ne se limite pas à un mécanisme de résistance donné, ni à une espèce de microorganisme donnée. Elle ne nécessite pas un inoculum lourd mais un inoculum comparable à celui utilisé par les méthodes usuelles en bactériologie.
- [0021] Aussi, l'antimicrobien peut être l'un quelconque choisi parmi les antibiotiques, les antifongiques, les agents antiparasitaires.
- [0022] Dans un mode de réalisation particulier, le microorganisme est une bactérie.
- [0023] On entend par « bactérie », tout type de bactérie, que ce soit de type à Gram négatif que de type à Gram positif.
- [0024] Dans ce mode de réalisation, l'antimicrobien est un antibiotique.
- [0025] On entend par « antibiotique », une substance organique naturelle ou synthétique qui exerce son action sur les bactéries en les détruisant (effet bactéricide) ou en inhibant leur croissance et leur multiplication (effet bactériostatique).
- [0026] Selon un aspect de l'invention, la population microbienne peut être issue d'un échantillon biologique.
- [0027] L'échantillon biologique peut en outre être d'origine humaine ou animale ; il peut aussi être d'origine environnementale.
- [0028] En particulier, l'échantillon biologique peut être un échantillon d'urines, de selles, d'expectorations, de pus, de liquides céphalo-rachidiens, de sang ou similaire.
- [0029] Selon un autre aspect de l'invention, l'échantillon biologique peut être une souche de référence.
- [0030] On entend par « souche de référence », une souche de microorganismes isolée dont les caractères ont été étudiés et qui est conservée sur une longue durée dans une banque de souches de référence.
- [0031] Ces deux aspects, à savoir un échantillon biologique et une souche de référence, constituent les « échantillons biologiques » au sens de la présente invention.

- [0032] Ces échantillons biologiques sont mis en culture en milieu gélosé afin d'obtenir une « population microbienne », qu'elle soit une population bactérienne, parasitaire, de champignon, de levure, etc.
- [0033] La population microbienne comme il est entendu dans la présente invention peut ainsi être une suspension microbienne obtenue à partir d'un mélange de colonies visuellement identiques isolées à partir d'un échantillon biologique.
- [0034] Cette suspension considérée visuellement comme homogène est alors incubée en présence d'antimicrobiens de diverses natures à différentes concentrations (traité) ou incubée sur la même durée en absence d'antimicrobien (témoin). Ces échantillons sont les « échantillons analytiques » qui seront élués dans le dispositif de fractionnement par couplage flux-force.
- [0035] Selon un mode de réalisation particulier, l'étape d'incubation avec l'antimicrobien peut avoir une durée allant de 30 à 120 minutes, de préférence de 30 à 60 minutes.
- [0036] De plus, l'étape d'incubation avec l'antimicrobien est effectuée dans un milieu de culture liquide.
- [0037] Aussi, le dispositif de fractionnement par couplage flux-force utilisé dans la méthode de l'invention peut être un dispositif de fractionnement par couplage flux-force de type multigravitationnel ou centrifuge, hydrodynamique, diélectrophorétique (DEP), électrique, magnétique, thermique, ou tout autre type de dispositif de fractionnement par couplage flux-force adapté.
- [0038] On parle de FFF « multigravitationnel », « de sédimentation » ou « centrifuge » (SdFFF ou CFFF) lorsque le champ appliqué est de nature gravitationnelle et de force $> 1g$. Ce champ est obtenu par la mise en rotation du canal de séparation. La force du champ est proportionnelle à la vitesse de rotation du canal de séparation.
- [0039] On parle de FFF « hydrodynamique » (FIFFF) lorsque le champ est de nature hydrodynamique, dans un canal symétrique, ou asymétrique (Asymetrical Flow FFF) et où seule la paroi d'accumulation est constituée d'une membrane semi-perméable.
- [0040] On parle de FFF « électrique » (EIFFF) lorsque le champ appliqué est de nature électrique, continu, ou cyclique. A cet effet, les parois du canal de séparation sont des électrodes.
- [0041] On parle de FFF « magnétique » (MgFFF) lorsque le champ appliqué est de nature magnétique.
- [0042] On parle de FFF « thermique » (ThFFF) lorsque le champ est de nature thermique, correspondant à un gradient de température entre les deux parois du canal de séparation.
- [0043] On parle de FFF « Diélectrophorétique » (DEP-FFF) lorsque le champ est un champ de diélectrophorèse.
- [0044] Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention, le dispositif de frac-

tionnement par couplage flux-force est un dispositif de fractionnement par couplage flux-force de type multigravitationnel.

[0045] Selon cet aspect, le dispositif de fractionnement par couplage flux-force fait intervenir une étape d'arrêt du flux de phase mobile communément appelée stop-flow.

[0046] L'étape de « stop-flow » correspond à l'étape de focalisation primaire de l'échantillon dans le canal de séparation. Suite à l'injection de l'échantillon, le flux de phase mobile conduit les espèces à séparer jusque dans le canal. Connaissant le système de séparation (volume de la boucle d'injection, volume des tubulures) et le débit appliqué, il est possible de calculer le temps nécessaire à l'entrée des espèces dans le canal. Lorsque les espèces sont en position dans le canal, on coupe le flux de phase mobile, il ne s'applique alors plus aux espèces que la force multigravitationnelle qui les conduit à la paroi d'accumulation où elles se concentrent, c'est la focalisation primaire. Après un temps suffisant d'absence de flux (= stop-flow), le flux de phase mobile est remis, les forces hydrodynamiques ascensionnelles s'exercent à nouveau, conduisant alors les espèces à leur position d'équilibre pour leur séparation, à savoir focalisation secondaire.

[0047] Il est entendu par « profil d'élution » ou « fractogramme » le diagramme qui représente la variation instantanée de concentration ou de quantité des espèces à la sortie du canal de séparation en fonction l'avancée de l'analyse = (concentration /quantité des espèces éluées) = f (temps ou volume d'élution). Il se compose dans la plupart des cas de deux pics majeurs, le premier correspondant au volume mort (espèces non retenues, temps d'élution = t_0), le second correspondant au pic de la population microbienne (espèces retenues, temps d'élution = $t_m > t_0$).

[0048] Selon la présente invention, les espèces non retenues correspondent aux molécules provenant du milieu de culture, aux débris biologiques ou cellulaires, etc., qui vont absorber le signal UV du détecteur, mais qui ne sont pas sensibles au champ employé. Par exemple, dans le cas de la SdFFF, aux vitesses de rotation qui sont appliquées, et donc aux champs gravitationnels utilisés (10-50g), les molécules de taille inférieure au μm , ne subissent pas l'effet du champ: elles sont donc non retenues. Elles progressent dans le système à la même vitesse que la phase mobile, c'est-à-dire le vecteur liquide dans l'appareil. Si on mesure le temps nécessaire à l'élution de ces espèces = temps mort ou t_0 , c'est le temps nécessaire à la phase mobile pour parcourir, le dispositif de fractionnement par couplage flux-force depuis le système d'injection (vanne de type Rhéodyne®) jusqu'au détecteur (de type spectrophotomètre UV-Vis) en passant par les tubulures et le canal de séparation inséré dans le bol de centrifugation.

[0049] En outre, le ou les signaux contenus dans le ou les profils d'élution du ou des échantillons analytiques qui sont analysés vis-à-vis de leur variabilité sont notamment la position du pic définie par le t_r , mesuré au sommet du pic, ou définie par la médiane

du pic, ou normalisée par le calcul du facteur de rétention, $R_{\text{obs}} = t_m/t_0$, ou toute autre méthode de détermination, ou la largeur du pic du profil d'élution.

[0050] La variation des signaux contenus dans les profils d'élution sera alors quantifiée. Elle s'exprime en % et correspond à un pourcentage de variation de $R_{\text{obs}} = \text{PAR}$; significatif d'un effet biologique soit le pourcentage de variation du facteur de rétention

[0051] [Math.1]

$$\text{PAR} = \frac{|\Delta R_{\text{Obs}}|}{R_{\text{ObsTémoïn}}} \times 100$$

[0052] Le « seuil de significativité » est le seuil à partir duquel la population microbienne est considéré comme sensible ou résistant à l'antimicrobien. Sa valeur est définie pour chaque couple microorganisme/antimicrobien, en fonction des doses usuelles actives de cet antimicrobien. Les valeurs seront référencées dans une banque de données dédiée.

[0053] Si la valeur mesurée de $\text{PAR} <$ au seuil de significativité, alors le micro-organisme est considéré comme résistant. Si la valeur mesurée de $\text{PAR} >$ au seuil de significativité, alors le micro-organisme est considéré comme sensible. Le degré de sensibilité du procédé de détection permet de mettre en évidence des profils « sensible » et « résistant » à un antimicrobien.

[0054] A titre d'exemple, PAR présente pour des souches de référence d'E. coli les valeurs suivantes :

[0055] Ex. Ampicilline:

[0056] Souche sensible incubée avec 4mg/ml $\approx 13\%$

[0057] Souche résistante incubée avec 4 mg/ml $\approx 5\%$

[0058] Souche résistante incubée avec 8 mg/ml $\approx 7\%$

[0059] Pour cette souche, les analyses ont permis de définir le seuil de significativité comme étant $\geq 10\%$

[0060] Selon l'invention, le seuil de significativité est défini pour chaque couple microorganisme/anti-microbien.

[0061] L'invention concerne aussi l'utilisation du dispositif de fractionnement par couplage flux-force selon le procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme de la présente invention.

[0062] L'invention concerne également un kit pour la détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien par une technique de fractionnement par couplage flux-force comprenant :

- [0063] – au moins un antimicrobien choisi parmi les antibiotiques, les antifongiques, les agents antiparasitaires ;
- facultativement au moins un tube destiné à l'incubation de la population microbienne ;

- facultativement au moins un composant choisi parmi un canal de séparation, des joints tournants, des tubulures, des membranes semi-perméables ou autres composants du dispositif de fractionnement par couplage flux-force ;
 - facultativement une ou plusieurs solutions de nettoyage et de décontamination desdits canal et/ou joints tournants et/ou tubulures ;
 - facultativement des instructions pour l'utilisation du kit.
- [0064] Selon ce mode de réalisation, les composants du kit que constituent notamment le canal de séparation, les joints tournants, les tubulures, les membranes semi-perméables sont prévus pour être à usage unique.
- [0065] Cependant, il est prévu de fournir dans le kit une ou plusieurs solutions de nettoyage et de décontamination des composants afin de réduire l'impact écologique et permettre leur réutilisation. Il est envisagé que puissent être utilisées au moins deux séries de kits en roulement, l'une en utilisation, l'autre en cours de nettoyage et décontamination. Aussi, les kits usagés pourront être récupérés par le fabricant pour assurer leur recyclage et reconditionnement, toujours dans une optique de réduire l'impact écologique et économique.
- [0066] On entend par « canal de séparation », le canal d'écoulement sur lequel est appliqué un champ externe de nature variable selon le type de FFF mis en œuvre et dans lequel circule les micro-organismes analysés.
- [0067] Celui-ci peut être constitué d'une feuille de matière plastique, le plus généralement du mylar dans laquelle est découpée la forme du canal. D'une manière générale, le canal est de forme soit trapézoïdale, soit parallélipipédique avec des pointes en V. La longueur (15 à 80 cm classiquement) et la largeur (8 à 20 mm classiquement) de cette forme découpée dans la feuille de matière plastique définit la longueur et la largeur du canal. L'épaisseur de la feuille de mylar définit elle l'épaisseur du canal (125 à 350 μm classiquement). Cette feuille est ensuite placée entre deux parois afin de définir le volume du canal, assurer l'étanchéité et le passage de la phase mobile et des échantillons.
- [0068] Les parois du canal de séparation varient selon le type de FFF. Dans le cas de la SdFFF, les parois sont non perméables et rigides. Ce type de parois est partagé avec la MgFFF. Pour la ThFFF, les parois sont des plaques non perméables qui sont chauffées à des températures différentes. Pour l'EIFFF, il s'agit d'électrodes. Pour la FIFFF, au moins l'une des deux parois est une paroi associée à une membrane semi-perméable et est constituée par un fritté.
- [0069] On entend par « joints-tournants » le dispositif qui permet le passage de la phase mobile et des échantillons en entrée et en sortie du canal de séparation depuis un référentiel fixe (à savoir pompe de phase mobile, injecteur d'échantillon, détecteur d'échantillon) à un référentiel en rotation (le canal de séparation). Ce passage doit se

faire sans fuite de liquide et donc de risque de dispersion de l'échantillon, et la potentielle contamination de l'opérateur. Les joints tournants sont des pièces stratégiques dans un appareil de SdFFF.

[0070] On entend par « tubulures » les tuyaux amenant les échantillons depuis l'injecteur d'échantillon vers le canal de séparation ainsi que ceux amenant les espèces séparées depuis le canal de séparation vers le détecteur.

[0071] Le détecteur diffère selon le type de technique de FFF. Le plus couramment utilisé est un détecteur de type spectrophotomètre UV-Vis permettant la mesure de la variation d'absorbance au cours du temps.

[0072] Ainsi, la présente invention concerne notamment un kit pour la détermination de la résistance d'une population bactérienne vis-à-vis d'un antibiotique par une technique de fractionnement par SdFFF comprenant :

- [0073] – au moins un antibiotique ;
- facultativement au moins un tube adapté à l'incubation de la population biologique ;
- au moins un canal de séparation ;
- facultativement au moins un composant choisi parmi des joints tournants et des tubulures du dispositif de fractionnement par couplage flux-force de type gravitationnel ;
- facultativement une ou plusieurs solutions de nettoyage et de décontamination desdits canal et/ou joints tournants et/ou tubulures ;
- facultativement des instructions pour l'utilisation du kit.

[0074] Pour mieux illustrer l'objet de la présente invention, on va décrire ci-après, à titre indicatif et non limitatif, un mode de réalisation particulier avec référence aux figures annexées.

[0075] Sur ces figures :

[0076] [Fig.1] représente le schéma analytique de mesure de la résistance à un antibiotique selon la mise en œuvre de l'Exemple 1.

[0077] [Fig.2] représente le fractogramme obtenu lors du test de la sensibilité de la souche *E.coli* ATCC 25922 à la kanamycine (0/1,5/3/6/12 µg/mL) selon l'Exemple 1.

[0078] [Fig.3A] représente les fractogrammes obtenus lors du test de la sensibilité de la souche *E.coli* ATCC 25922 à la chlortétracycline selon l'Exemple 1.

[0079] [Fig.3B] représente les fractogrammes obtenus lors du test de la sensibilité de la souche *E.coli* ATCC 25922 aux huiles essentielles de cannelle selon l'Exemple 1.

[0080] [Fig.3C] représente les fractogrammes obtenus lors du test de la sensibilité de la souche *E.coli* ATCC 25922 aux huiles essentielles d'origan selon l'Exemple 1.

[0081] [Fig.4] représente le schéma analytique de mesure de la résistance à un antibiotique selon la mise en œuvre de l'Exemple 2.

- [0082] [Fig.5] représente les fractogrammes obtenus lors du test de la sensibilité à l'ampicilline de la souche *E.coli* ATCC 35218 (A) par rapport à la souche *E.coli* ATCC 25922 (B) mettant en évidence la résistance de la souche 35218 contrairement à la souche 25922, selon l'Exemple 2.
- [0083] [Fig.6] représente le schéma analytique de la méthode de détection de la résistance à un antibiotique selon la présente invention (A) par comparaison aux techniques actuelles (B).
- [0084] Si l'on se réfère à la [Fig.1], on peut y voir résumé le protocole de la méthode de détection selon la mise en œuvre de l'Exemple 1. Les résultats de l'analyse de la résistance à l'antimicrobien sont attendus à compter de 40 heures après la mise en culture de l'échantillon sur gélose.
- [0085] Si l'on se réfère à la [Fig.2], on peut y voir la superposition de 5 profils d'élution obtenus pour la souche de référence *E.coli* ATCC EC 25922, incubée en absence (témoin) ou en présence de doses croissantes de kanamycine (1,5 à 12 µg/mL) selon le protocole décrit dans la [Fig.1]. Les profils d'élution ou fractogrammes ont été produits dans les conditions d'élution également décrits dans la [Fig.1]. La valeur de t_0 est en moyenne de 0,96 min. A titre d'exemple sont indiqués les temps de rétention (t_r) pour les conditions témoins (en moyenne 3,22 min) et traitées par 3 µg/mL de kanamycine (3,62 min en moyenne) permettant les calculs de Robs pour le témoin (0,299) et les échantillons traités (0,265 pour 3 µg/ml), ce qui correspond à un pourcentage de variation du facteur de rétention $P\Delta R = 11,2\%$; 10% pouvant être considéré comme étant le seuil de significativité. A cette concentration, qui correspond à la concentration minimale inhibitrice de la kanamycine, la souche est bien sensible à l'antimicrobien.
- [0086] D'une manière similaire, si l'on se réfère à la [Fig.3A], on peut y voir la superposition de 5 profils d'élution obtenus pour la souche de référence *E.coli* ATCC EC 25922, incubée en absence (témoin) ou en présence de doses croissantes de chlortétracycline (0,015 à 0,125 µg/mL) selon le protocole décrit dans la [Fig.1]. Les profils d'élution ou fractogrammes ont été produits dans les conditions d'élution également décrits dans la [Fig.1]. La valeur de t_0 est en moyenne de 0,96 min. A titre d'exemple sont indiqués les temps de rétention (t_r) pour les conditions témoins (en moyenne 2,62 min) et traitées par 0,03 µg/mL de kanamycine (3,36 min en moyenne) permettant les calculs de Robs pour le témoin (0,367) et les échantillons traités (0,286 pour 0,03 µg/ml), ce qui correspond à un $P\Delta R = 22\%$; 10% pouvant être considéré comme seuil de significativité. A cette concentration, qui correspond à la concentration minimale inhibitrice de la chlortétracycline, la souche est bien sensible à l'antimicrobien.
- [0087] D'une manière similaire, si l'on se réfère aux Figures 3B et 3C, on peut y voir que la souche *E.coli* 25922 est également significativement sensible à l'action de l'Huile essentielle de Cannelle puisque $P\Delta R = 40\%$, à l'action de l'Huile essentielle d'Origan

puisque $P\Delta R = 13,9\%$.

[0088] Si l'on se réfère à la [Fig.4], on peut y voir résumé le protocole de la méthode de détection selon la mise en œuvre de l'Exemple 2. Les résultats de l'analyse de la résistance à l'antimicrobien sont attendus à compter de 18-26 heures après la mise en culture de l'échantillon sur gélose.

[0089] Sur la Figure 5A, on peut voir 3 profils d'élution obtenus pour la souche de référence E.coli ATCC EC 35218, incubée en absence (témoin) ou en présence de doses croissantes d'ampicilline (4 ou 8 mg/mL) selon le protocole décrit dans la [Fig.4]. Les profils d'élution ou fractogrammes ont été produits dans les conditions d'élution également décrits dans la [Fig.4]. La valeur de t_0 est en moyenne de 0,96 min. A titre d'exemple sont indiqués les temps de rétention (t_r) pour les conditions témoins (en moyenne 3,74 min) et traitées par 4 mg/ml d'ampicilline (3,58 min en moyenne) permettant les calculs de Robs pour le témoin (0,257) et les échantillons traités (0,269 pour 4 mg/mL), ce qui correspond à un pourcentage de variation du facteur de rétention $P\Delta R = 4,50$; 10% pouvant être considéré comme seuil de significativité.

[0090] A cette concentration, la souche est résistante à l'antimicrobien.

[0091] D'une manière similaire, si l'on se réfère à la Figure 5B, les profils d'élution de la souche de référence E.coli ATCC EC 25922, incubée en absence (témoin) ou en présence de doses croissantes d'ampicilline (4 ou 8 mg/mL), alors on peut voir que, contrairement à la souche E.coli ATCC EC 35218, E.coli 25922 est sensible à l'ampicilline. En effet, les temps de rétention (t_r) pour les conditions témoins (en moyenne 2,66 min) et traitées par 4 mg/mL d'ampicilline (2,36 min en moyenne) permettant les calculs de Robs pour le témoin (0,362) et les échantillons traités (0,408 pour 4 mg/ml), ce qui correspond à un pourcentage de variation du facteur de rétention $P\Delta R = 12,70$; 10% pouvant être considéré comme seuil de significativité. A cette concentration, la souche est sensible à l'antimicrobien.

[0092] Pour finir, la [Fig.6] permet de mettre en évidence le gain de temps permis par la présente invention par comparaison aux techniques actuelles. Ce gain de temps non négligeable constitue une avancée majeure dans les techniques de détection de la résistance de micro-organismes aux antimicrobiens. Ceci permet d'aiguiller le clinicien ou vétérinaire vers l'approche thérapeutique la plus appropriée de façon précoce.

[0093]

EXEMPLES

[0094] *Matériels & Méthodes*

[0095] Le dispositif de fractionnement par couplage flux-force est établi conformément au brevet EP1679124. Le dispositif comprend un système d'injection où est pris en charge l'échantillon, la tubulure amenant l'échantillon depuis l'injecteur vers le canal de sé-

paration, via un premier joint tournant, le canal de séparation contenu dans un bol de centrifugation dont la mise en rotation est assurée par un moteur électrique lui-même contrôlé manuellement ou via un dispositif informatique adapté, permettant ainsi le contrôle de l'intensité du champ multigravitationnel, la tubulure amenant les espèces séparées depuis le canal vers le détecteur, via le second joint tournant, et enfin le détecteur.

[0096] Milieu de culture: Difco TM Mueller Hinton Broth (Becton Dickinson, référence 275730)

[0097] Souches bactériennes utilisées : *E.coli* 25922 et 35218 (ATCC, Manassas, VA, USA).

[0098] Antibiotiques: Ampicilline (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France, réf. 21442020), Kanamycine (MP Biomedical, Illkirch FRANCE, réf. 150020) Chlortétracycline (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France, Ref 17776).

[0099] *Conditions de culture*

[0100] Les colonies bactériennes ont été incubées dans du milieu de culture Mueller-Hinton (MH) à raison d'un inoculum de 0,5 McFarland en absence ou en présence d'antibiotique pendant une durée de 2 heures à 37°C et sous agitation. Ce milieu liquide MH est le milieu de référence utilisé pour la méthode de référence de détermination des CMI, appelée méthode par dilution en milieu liquide.

[0101] Après 2h d'incubation, le milieu de culture a été centrifugé puis repris dans un volume de 0,5 mL de PBS.

[0102] *Exemple de calcul du pourcentage de variation de Robs:*

[0103] Selon les manipulations reproduites en [Fig.5], le calcul du pourcentage de variation du facteur de rétention ou PAR s'effectue comme suit :

[0104] [Tableaux1]

Souche	Antibiotique	Caractère de résistance	CMI	Concentration	t ₀ (min)	t _c (min)	R _{obs}	PAR
E. coli 25922	Ampicilline	Sensible	4mg/ml	0 (témoin)	0,962	2,6589922	0,262	12,70%
				4 mg/ml		2,2601177	0,408	
E. coli 25922	Ampicilline	Sensible	4mg/ml	0 (témoin)		2,6589922	0,262	22,30%
				8 mg/ml		2,1748959	0,442	
E. coli 35218	Ampicilline	Résistant	4mg/ml	0 (témoin)		2,7288757	0,257	4,50%
				4 mg/ml		2,5787297	0,269	
E. coli 35218	Ampicilline	Résistant	4mg/ml	0 (témoin)		2,7288757	0,257	6,60%
				8 mg/ml		2,5076629	0,274	

[0105] [Math 2]
$$PAR = \frac{|R_{ObsTémoin} - R_{Obstraité}|}{R_{ObsTémoin}} \times 100 = \frac{|\Delta R_{Obs}|}{R_{ObsTémoin}} \times 100 ;$$

[0106] Tableau 1 : Résultats de l'analyse des fractogrammes selon l'expérience représentée en Figures 5A et 5B : calcul des PAR permettant, par comparaison au seuil de significativité, fixé à 10% pour ces souches et cet antibiotique, la détermination de la ré-

sistance des souches d' *E.coli* 25922 et 35218 vis-à-vis de l' Ampiciline

[0107] Exemple 1 : Résultats de tests de résistance de la souche *E.coli* ATCC 25922 à diverses molécules au moyen de la SdFFF selon la présente invention.

[0108] Ces résultats ont permis d'établir un premier protocole de préparation de la population de microorganismes, en l'espèce de la suspension bactérienne ([Fig.1]).

[0109] Les conditions d'élution en SdFFF ont été adaptées à partir de celles utilisées communément dans les pratiques de tri cellulaire pour des cellules eucaryotes.

L'introduction directe de l'échantillon dans la direction opposée au champ de gravité, permettant une relaxation rapide des espèces dans les lignes de flux efficaces pour leur séparation est ici optimisée par une brève étape supplémentaire de stop-flow, du fait des petites tailles ($< 2 \mu\text{m}$) des espèces à séparer.

[0110] Les conditions de base ont été établies de la manière suivante :

- [0111] – Débit de phase mobile : 1,2 mL/min ;
- Champ multigravitationnel : 20g ;
- Stop-flow : 2 min.

[0112] Avec ces conditions, il a été possible d'obtenir une réponse après seulement 1 heure d'incubation.

[0113] Les résultats ([Fig.2] et 3A) sur le modèle de souche de *E.coli* ATCC 25922 vis-à-vis de la kanamycine (concentration croissante de 0 à 12 $\mu\text{g/mL}$) et de la Chlorotétracycline (0,015 à 0,125 $\mu\text{g/mL}$) permettent de démontrer la capacité de l'appareil de SdFFF à enregistrer des modifications de rétention, à savoir des réponses dont l'intensité varie selon la concentration de l'antibiotique utilisé.

[0114] Ces résultats montrent que le procédé de détection de la présente invention permet une réponse quantitative, dose-dépendante, qui est complémentaire de sa dimension qualitative, à savoir la mesure du seuil de significativité de la résistance vs. sensibilité à l'antimicrobien. Le degré de sensibilité du procédé de détection repose sur la faculté de l'appareil de FFF à enregistrer des variations de rétention en fonction de la concentration d'antimicrobien utilisée.

[0115] Sur ces figures, on observe en ce qui concerne le pic d'élution des bactéries une diminution du facteur de rétention $= R_{\text{obs}} = t_0 / t_{\text{r}_n}$, caractéristique de l'induction de l'événement biologique lié à l'incubation en présence d'antibactériens.

[0116] Ces résultats très encourageants ont permis d'envisager de pouvoir réduire de 24 heures environ le temps nécessaire pour rendre le résultat d'un antibiogramme par rapport aux méthodes existantes.

[0117] Exemple 2 : Un nouveau protocole d'analyse a été établi selon la [Fig.4], fidèle à la mise en œuvre en clinique des antibiogrammes classiques, permettant de réduire à 26 heures post-prélèvement/isolément l'obtention des résultats du test.

[0118] Classiquement, la réalisation d'un antibiogramme se fait à partir de colonies bac-

tériennes obtenues à partir d'un prélèvement biologique. Le délai d'obtention de ces colonies est en moyenne de 16-24 heures, mais il peut être parfois plus court, de l'ordre de 10-12 heures selon les espèces bactériennes. Ces colonies sont alors remises en suspension en milieu liquide et incubées pendant 16-24 heures avec différents antibiotiques selon les recommandations du CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) en vigueur.

- [0119] Ainsi, ces essais ont été réalisés directement sur des suspensions bactériennes, obtenues à partir de colonies de la souche *E.coli* ATCC 25922 et ATCC 35218 cultivées pendant 16-24 heures sur milieu gélosé, et incubées pendant 2 heures en présence ou non d'antibiotique (Ampicilline Figures 5A/B).
- [0120] Il a ainsi été possible de confirmer la variation dose-dépendante du facteur R_{obs} pour un antibiotique, sur différentes souches (sensibles/résistantes) de bactéries *E.coli*.
- [0121] La différence de comportement de la souche bactérienne est mise en évidence par la mesure de R_{obs} , le calcul du $P\Delta R$ et sa comparaison par rapport à des seuils de significativité permettant d'indiquer la sensibilité ou la résistance de la souche bactérienne à l'action bactéricide ou bactériostatique de l'antibiotique testé.
- [0122] La résistance à l'antimicrobien est mesuré par comparaison de $P\Delta R$ au seuil de significativité, $P\Delta R$ s'exprime selon la formule ci-après :
- [0123] Considérant le $P\Delta R = \frac{|\Delta R_{obs}|}{R_{ObsTémoin}} \times 100$,
- [0124] si la valeur mesurée $P\Delta R < \text{seuil de significativité}$; alors le micro-organisme est considéré comme résistant.
- [0125] D'une manière similaire, si la valeur mesurée $P\Delta R > \text{seuil de significativité}$; alors le micro-organisme est considéré comme sensible.
- [0126] Cette mesure, uniquement basée sur des variations de propriétés biophysiques intrinsèques liée à l'action de l'antibiotique sur la souche bactérienne, ne fait appel à aucune préparation spécifique de l'échantillon, ni à aucun réactif spécifique ou coûteux. Compte-tenu de la sensibilité de la méthode de séparation aux variations de ces paramètres (taille, densité, forme, déformabilité, motilité, etc.), la lecture de l'antibiogramme peut se faire de façon très précoce (24 heures après la récupération du prélèvement pathologique et isolement et identification du germe), permettant de rendre un diagnostic au clinicien avec un gain de près de 24 heures sur les protocoles actuels.
- [0127] La [Fig.6] reprend le schéma analytique général du procédé de l'invention et le présente en parallèle aux protocoles actuels dans l'état de la technique.
- [0128] Le caractère inventif de la présente invention réside dans la simplicité et la rapidité de sa mise en œuvre. Le procédé présente l'avantage de permettre l'automatisation des étapes, dès l'injection automatique des échantillons dans le dispositif jusqu'à

l'obtention du résultat en termes de sensible/résistant. L'appareillage est prévu pour être spécialement conçu pour faciliter la maintenance, la manipulation stérile et sans risque pour l'opérateur, et le changement rapide du canal de séparation, pièce conçue pour un usage unique, par exemple dans un kit selon l'invention : un canal = un microorganisme = un antibiogramme.

- [0129] La simplicité et la rapidité du procédé de l'invention reposent sur le fait qu'il est complètement dépourvu de traitement préalable de l'échantillon à éluer, aboutissant plus rapidement à l'obtention des résultats.
- [0130] Le procédé de l'invention possède en outre un aspect d'universalité et est applicable à tout type de microorganisme, à savoir des bactéries, des champignons, des levures, des protozoaires. Il n'est pas préalablement nécessaire d'identifier un antigène spécifique qui doit permettre de séparer les populations microbiennes comme cela est requis avec la cytométrie en flux.
- [0131] La technique de séparation par couplage flux-force ne présente pas d'a priori et est applicable quelle que soit la nature du microorganisme.
- [0132] Il est bien entendu que les modes de réalisation ci-dessus de la présente invention ont été donnés à titre indicatif et non limitatif et que des modifications pourront y être apportées sans que l'on s'écarte pour autant du cadre de la présente invention. En particulier, d'autres plages de mesure, précisions, dimensions et caractéristiques des moyens d'acquisition de données et de conditions peuvent être sélectionnées en fonction de l'utilisation visée.

Revendications

[Revendication 1]

– Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien, caractérisé par le fait que le procédé comprend les étapes consistant à :

- se procurer au moins une population microbienne de microorganismes à partir d'un échantillon biologique ;
- traiter une partie de chaque population microbienne avec l'antimicrobien, l'autre partie n'étant pas traitée avec ledit antimicrobien ;
- incuber ladite ou lesdites populations microbiennes avec ou sans antimicrobien, obtenant ainsi respectivement le ou les échantillons analytiques traités et le ou les échantillons analytiques témoins ;
- éluer le ou les échantillons analytiques de l'étape précédente dans un dispositif de fractionnement par couplage flux-force ;
- obtenir les profils d'élution du ou des échantillons analytiques traités et du ou des échantillons analytiques témoins pour chaque population microbienne ;
- et quantifier la variation des signaux contenus dans les profils d'élution du ou des échantillons analytiques témoins et du ou des échantillons analytiques traités par l'antimicrobien et la comparer à un seuil de significativité ;

dans lequel, lorsque la variation des signaux contenus dans le ou les profils d'élution du ou des échantillons analytiques traités par l'antimicrobien par rapport au profil d'élution du ou des échantillons analytiques témoins est supérieure au seuil de significativité, alors le microorganisme de ladite population microbienne est considéré comme sensible à l'antimicrobien.

[Revendication 2]

- Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon la revendication 1, dans lequel le microorganisme est l'un quelconque choisi parmi les bactéries, les champignons, les levures, les protozoaires.

[Revendication 3]

- Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon l'une des revendications 1 ou 2, dans lequel l'antimicrobien est l'un quelconque choisi parmi les anti-

biotiques, les antifongiques, les agents antiparasitaires.

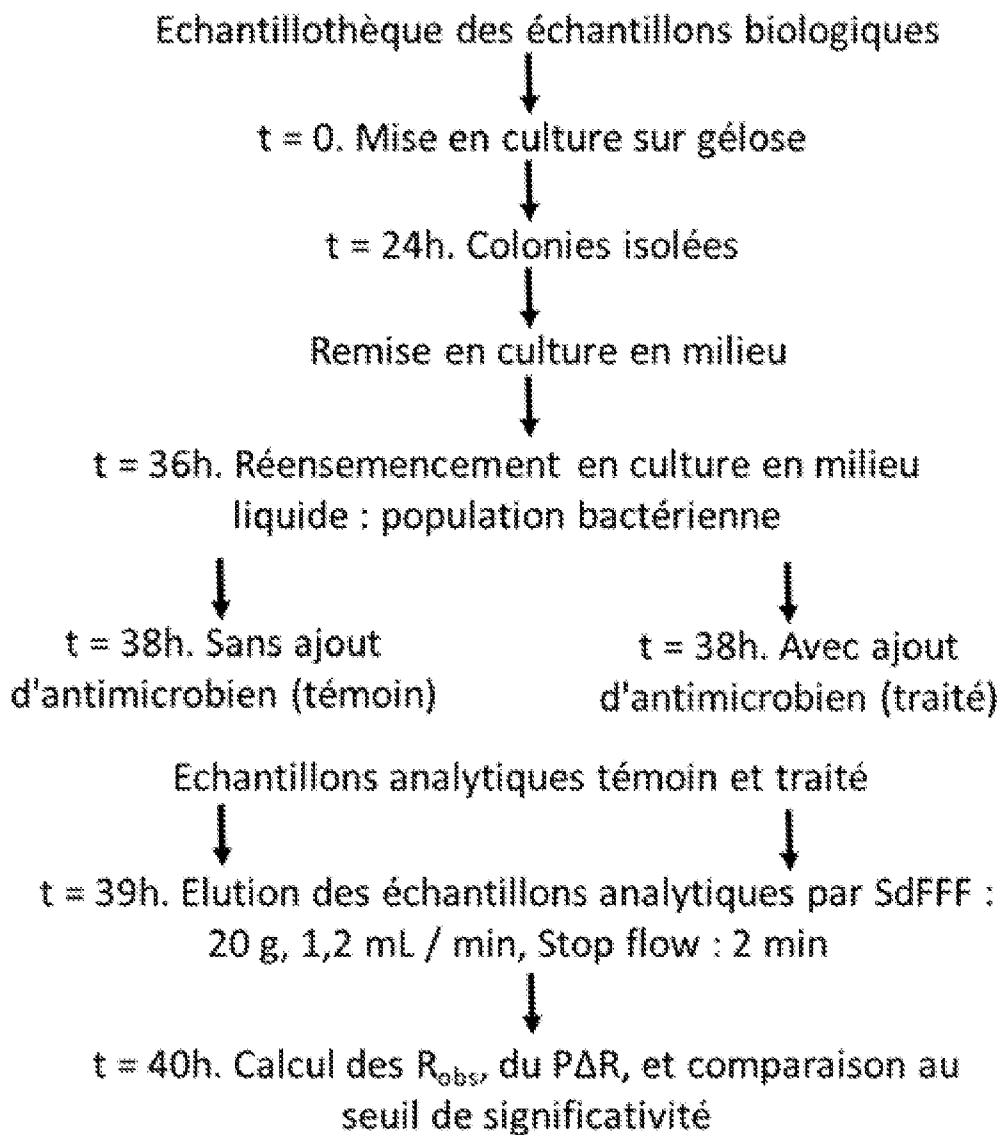
- [Revendication 4] - Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel le microorganisme est une bactérie.
- [Revendication 5] - Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon la revendication 4, dans lequel l'antimicrobien est un antibiotique.
- [Revendication 6] - Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la population microbienne est issue d'un échantillon biologique.
- [Revendication 7] - Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon la revendication 6, dans lequel l'échantillon biologique est d'origine humaine ou animale ou est d'origine environnementale.
- [Revendication 8] - Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon l'une des revendications 6 ou 7, dans lequel l'échantillon biologique est un échantillon d'urines, de selles, d'expectorations, de lavages broncho-alvéolaires, de pus, de liquide céphalo-rachidien, de sang ou similaire.
- [Revendication 9] - Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel l'échantillon biologique est une souche de référence.
- [Revendication 10] - Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel l'étape d'incubation avec l'antimicrobien a une durée allant de 30 à 120 minutes, de préférence de 30 à 60 minutes.
- [Revendication 11] - Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans lequel le dispositif de fractionnement par couplage flux-force est un dispositif de fractionnement par couplage flux-force de type multigravitationnel ou centrifuge, hydrodynamique, diélectrophorétique (DEP), électrique, magnétique, thermique, ou tout autre type de dispositif de fractionnement par couplage flux-force adapté.
- [Revendication 12] - Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon l'une quelconque des reven-

dications 1 à 11, dans lequel le dispositif de fractionnement par couplage flux-force est un dispositif de fractionnement par couplage flux-force de type multigravitationnel.

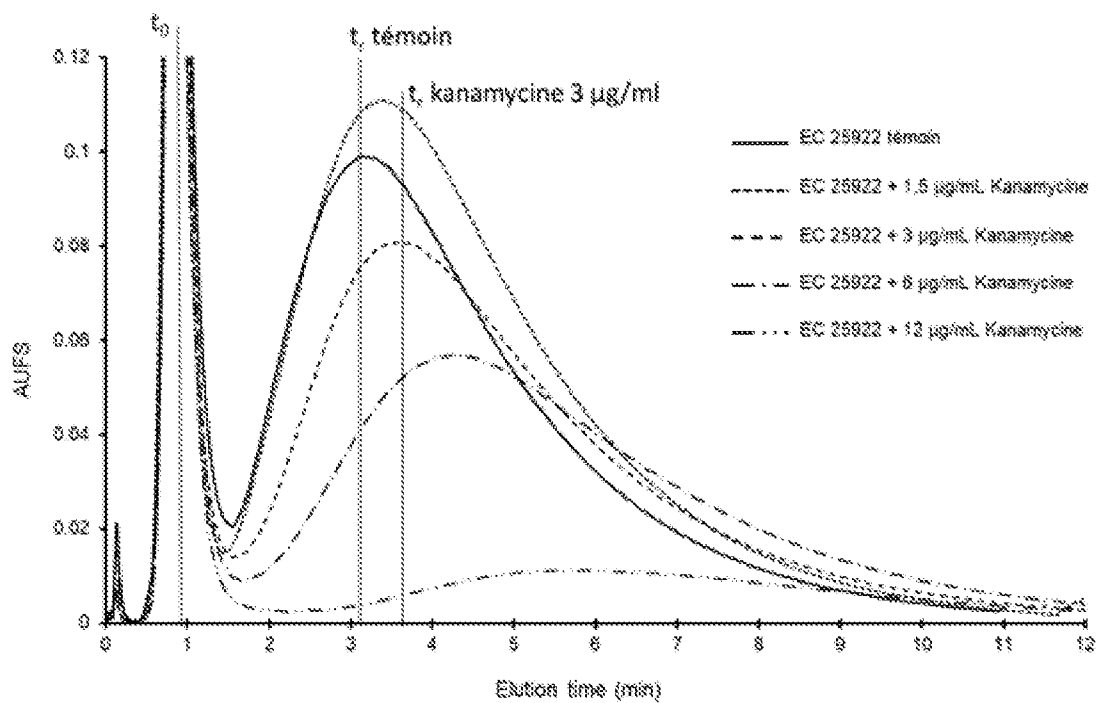
- [Revendication 13] - Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans lequel le ou les signaux contenus dans le ou les profils d'élution du ou des échantillons analytiques qui sont analysés vis-à-vis de leur variabilité sont notamment la position du pic définie par le t_r mesuré au sommet du pic, ou définie par la médiane du pic, ou normalisée par le calcul du facteur de rétention, $R_{obs} = t_m/t_0$ ou toute autre méthode de détermination, ou la largeur du pic du profil d'élution.
- [Revendication 14] - Procédé de détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans lequel le seuil de significativité est défini pour chaque couple microorganisme/antimicrobien.
- [Revendication 15] - Utilisation d'un dispositif de fractionnement par couplage flux-force dans l'étape d'élution du procédé de détermination selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.
- [Revendication 16] - Kit pour la détermination de la résistance d'un microorganisme vis-à-vis d'au moins un antimicrobien par une technique de fractionnement par couplage flux-force comprenant :
- au moins un antimicrobien choisi parmi les antibiotiques, les antifongiques, les agents antiparasitaires ;
 - facultativement au moins un tube adapté à l'incubation de la population microbienne ;
 - facultativement au moins un composant choisi parmi un canal de séparation, des joints tournants, des tubulures, des membranes semi-perméables ou autres composants du dispositif de fractionnement par couplage flux-force ;
 - facultativement une ou plusieurs solutions de nettoyage et de décontamination desdits canal et/ou joints tournants et/ou tubulures ;
 - facultativement des instructions pour l'utilisation du kit.
- [Revendication 17] - Kit pour la détermination de la résistance d'une population bactérienne vis-à-vis d'un antibiotique par une technique de fractionnement par SdFFF comprenant :

- au moins un antibiotique ;
- facultativement au moins un tube adapté à l'incubation de la population biologique ;
- au moins un canal de séparation ;
- facultativement au moins un composant choisi parmi des joints tournants et des tubulures du dispositif de fractionnement par couplage flux-force de type gravitationnel ;
- facultativement une ou plusieurs solutions de nettoyage et de décontamination desdits canal et/ou joints tournants et/ou tubulures ;
- facultativement des instructions pour l'utilisation du kit.

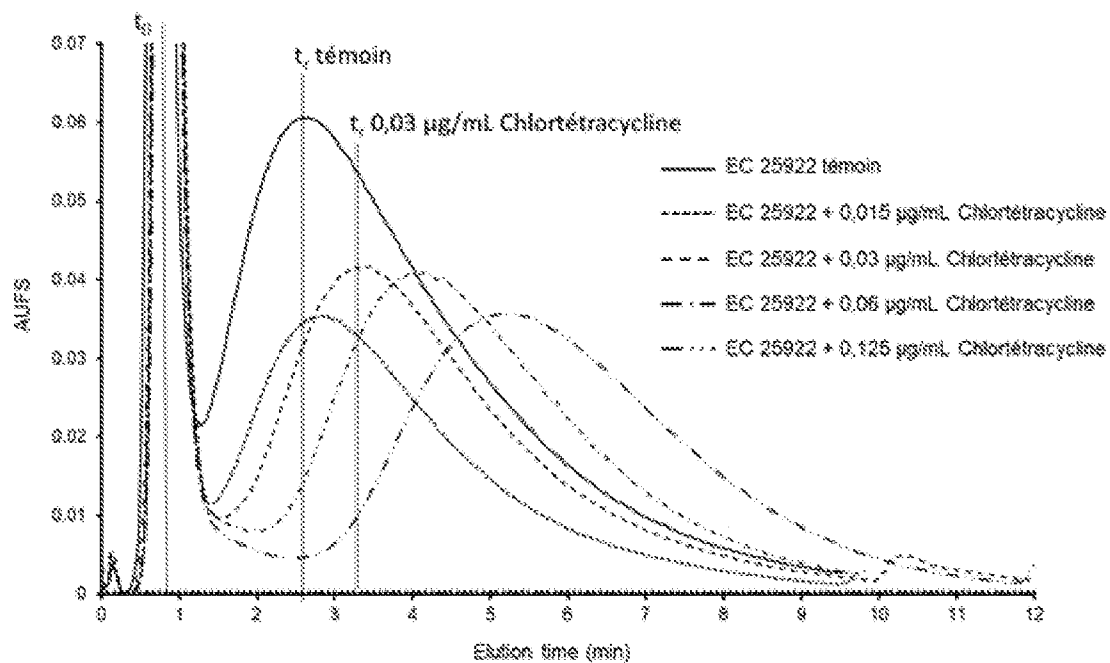
[Fig. 1]



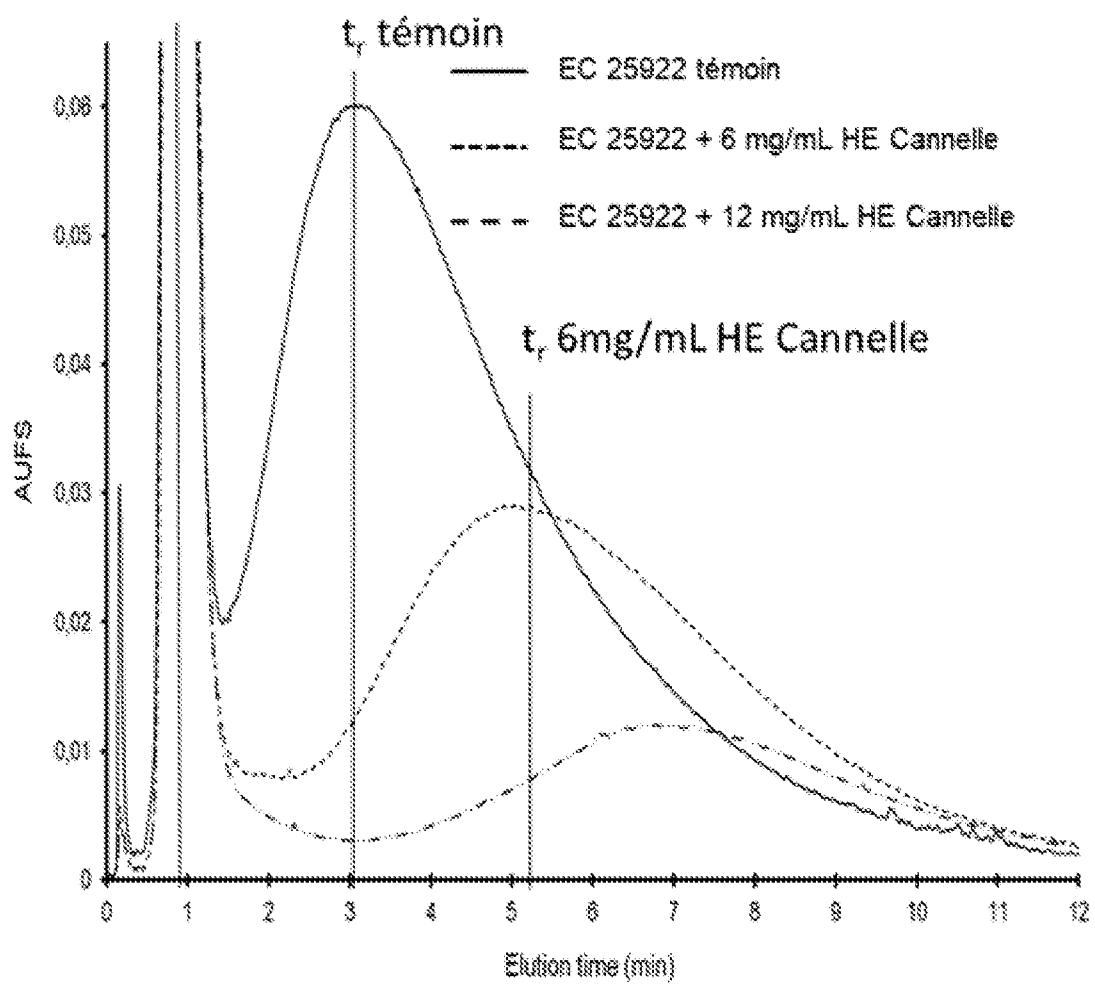
[Fig. 2]



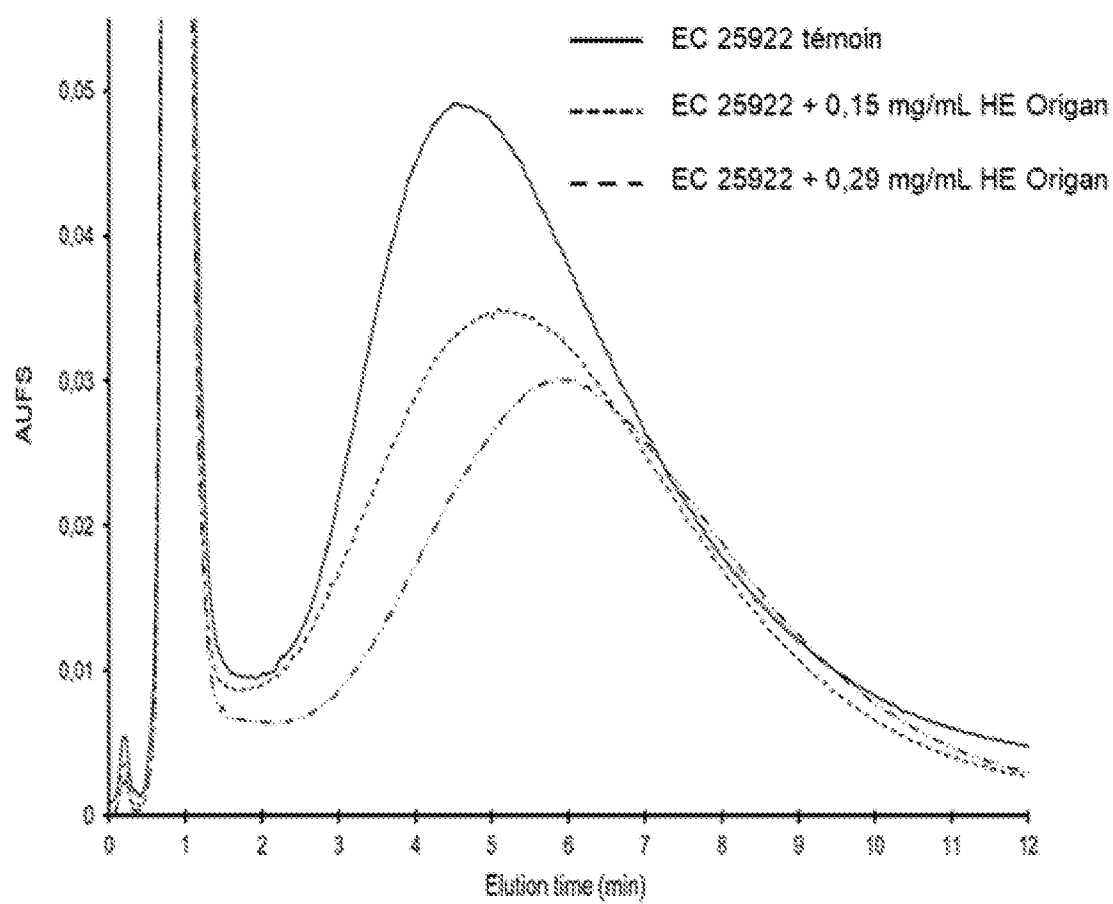
[Fig. 3A]



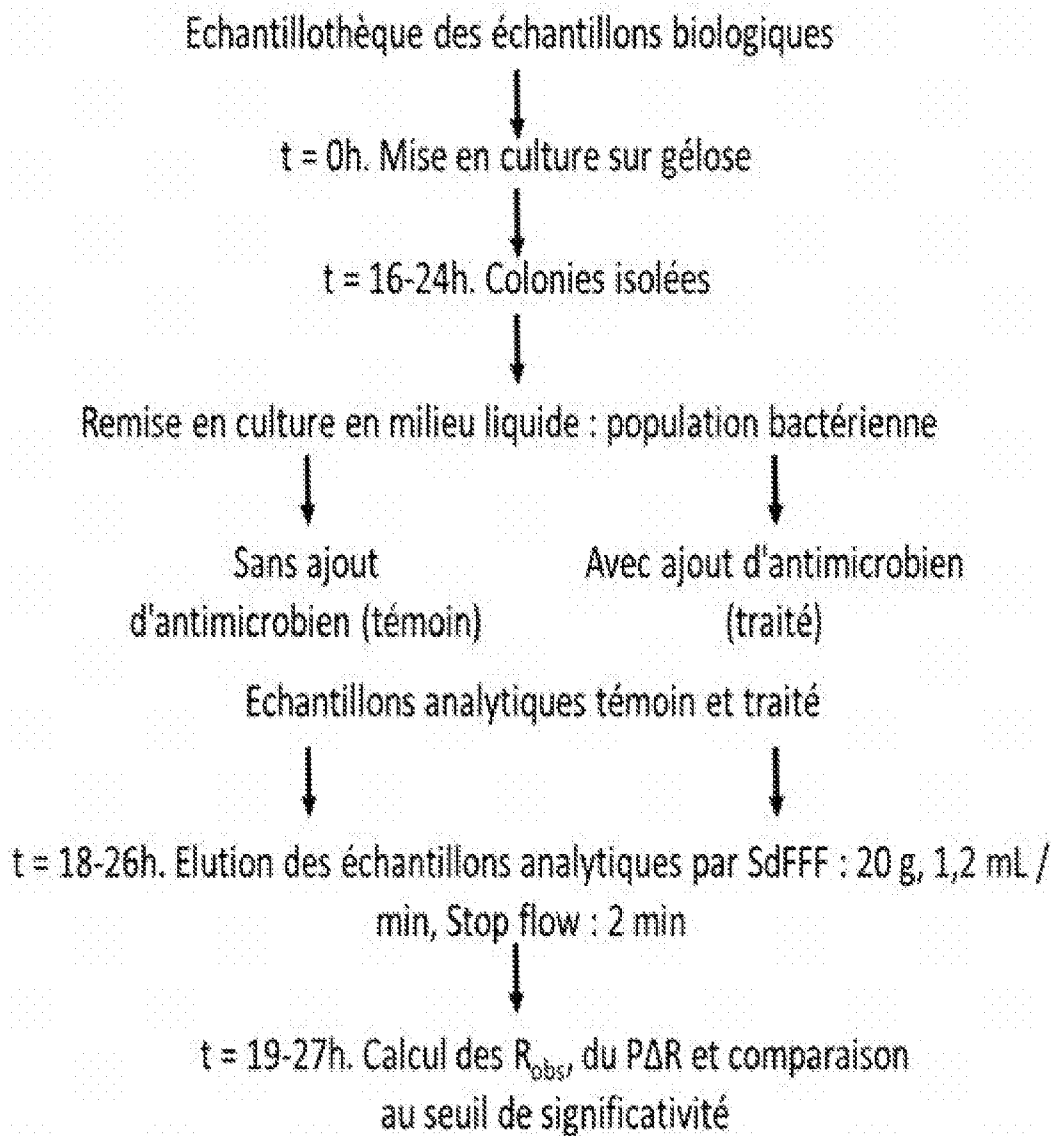
[Fig. 3B]



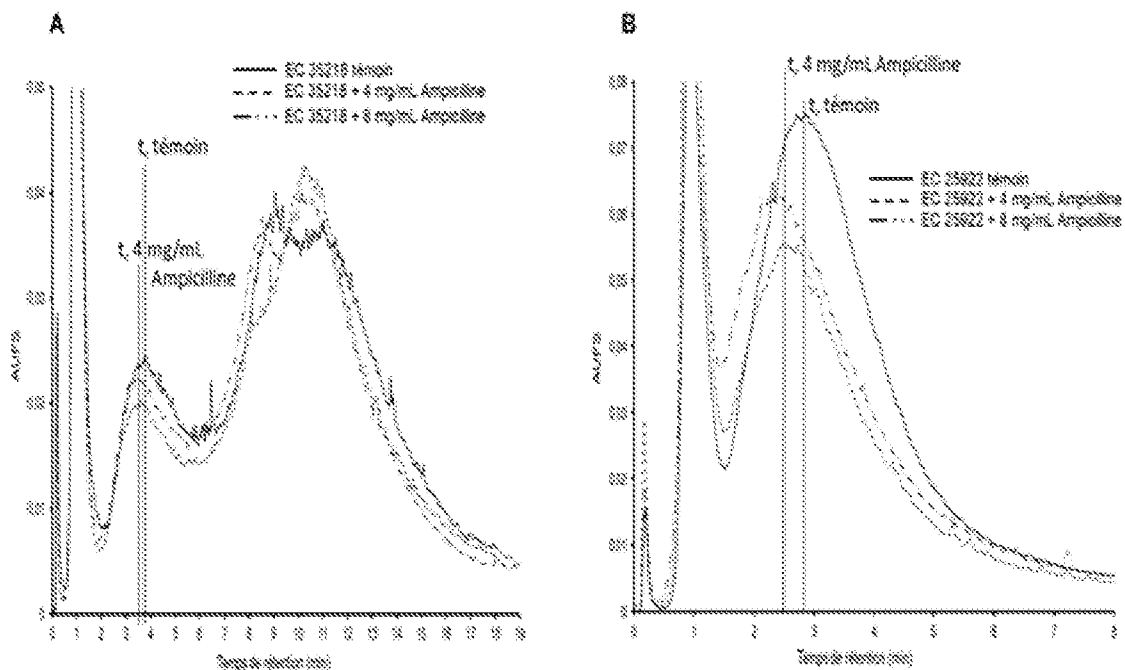
[Fig. 3C]



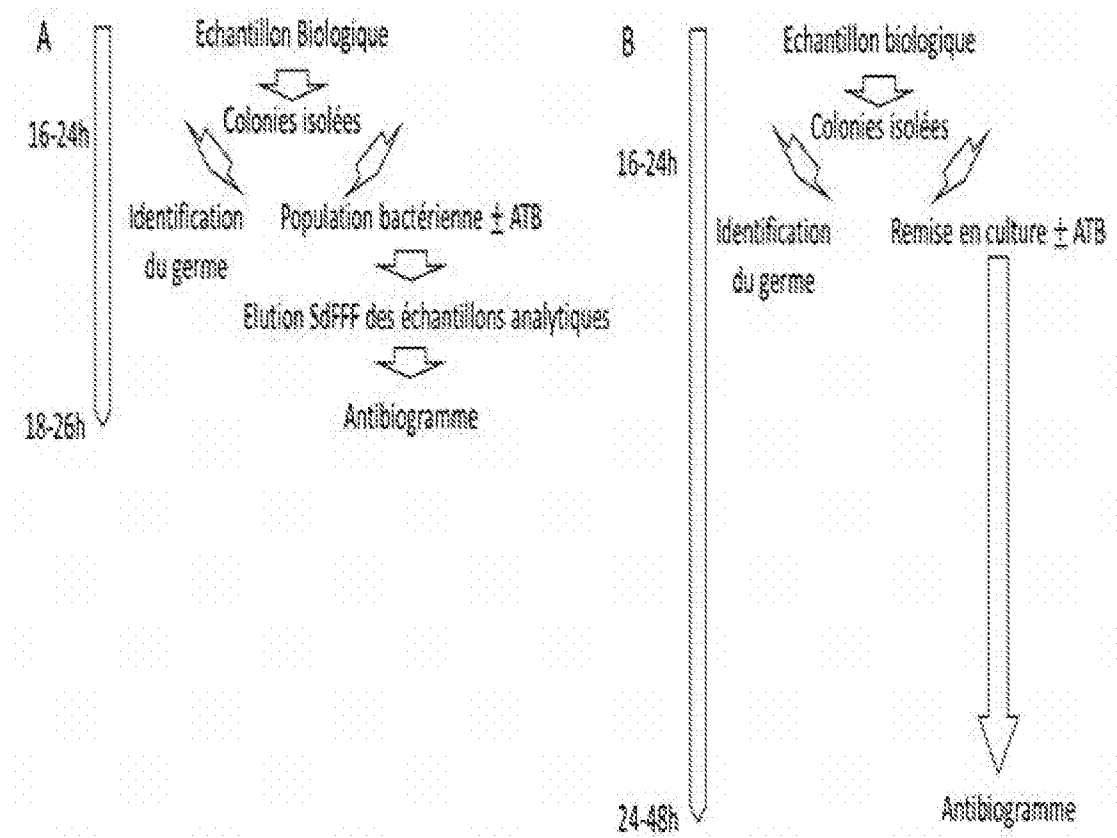
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/052832

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12Q 1/04</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/06</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/18</i> (2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012164547 A1 (UNIV DO PORTO [PT]; AZEVEDO PINA VAZ CIDALIA IRENE [PT] ET AL.) 06 December 2012 (2012-12-06)	16,17
Y	the whole document page 2 , fourth paragraph - page 9, first paragraph; claims 1-27; figures 1-7	1-15
Y	SATAWAT SAENTON ET AL. "Evaluation of Different Field-Flow Fractionation Techniques for Separating Bacteria" <i>SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY</i> , US, Vol. 35, No. 11, 10 January 2000 (2000-01-10), pages 1761-1775 DOI: 10.1081/SS-100102492 ISSN: 0149-6395, XP055753735 the whole document abstract figure 4 page 1763 - page 1774; figures 2,3	1-17
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 June 2021		Date of mailing of the international search report 13 July 2021
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Boiangiu, Clara Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RESCHIGLIAN P ET AL. "Field-flow fractionation and biotechnology" <i>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB</i>, Vol. 23, No. 9, 01 September 2005 (2005-09-01), pages 475-483, [retrieved on 2005-09-01] ISSN: 0167-7799, XP027778169 the whole document abstract all figures	1-17
Y	SHARMA R V ET AL. "Analysis of bacteria in aquatic environments using sedimentation field-flow fractionation: (I) biomass determination" <i>WATER RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL</i>, Vol. 32, No. 5, 01 March 1998 (1998-03-01), pages 1497-1507, [retrieved on 1998-03-01] ISSN: 0043-1354, XP027124161 the whole document abstract; figures 1-5; tables 1-3	1-17
Y	RESHMI V. SHARMA ET AL. "Physical Characterization and Quantification of Bacteria by Sedimentation Field-Flow Fractionation" <i>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, US</i>, Vol. 59, No. 6, 01 January 1993 (1993-01-01), pages 1864-1875 DOI: 10.1128/AEM.59.6.1864-1875.1993 ISSN: 0099-2240, XP055753738 the whole document	1-17
Y	HOOKEUN LEE AND S KIM RATANATHANAWONGS WILLIAMS ET AL. "Analysis of Whole Bacterial Cells by Flow Field-Flow Fractionation and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry" <i>ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY</i>, Vol. 75, No. 11, 01 June 2003 (2003-06-01), pages 2746-2752, [retrieved on 2003-05-30] DOI: 10.1021/AC020698U ISSN: 0003-2700, XP007910557 the whole document	1-17
Y	FERNANDEZ RENNY E ET AL. "Review: Microbial analysis in dielectrophoretic microfluidic systems" <i>ANALYTICA CHIMICA ACTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL</i>, Vol. 966, 06 March 2017 (2017-03-06), pages 11-33 DOI: 10.1016/J.ACA.2017.02.024 ISSN: 0003-2670, XP029964060 the whole document	1-17
Y	KATRI ESKELIN ET AL. "Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation on Virus and Virus- Like Particle Applications" <i>MICROORGANISMS</i>, Vol. 7, No. 11, 12 November 2019 (2019-11-12), page 555 DOI: 10.3390/microorganisms7110555 XP055753719 the whole document	1-17
Y	CITKOWICZ A ET AL. "Characterization of virus-like particle assembly for DNA delivery using asymmetrical flow field-flow fractionation and light scattering" <i>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL</i>, Vol. 376, No. 2, 15 May 2008 (2008-05-15), pages 163-172, [retrieved on 2008-02-19] DOI: 10.1016/J.AB.2008.02.011 ISSN: 0003-2697, XP022607155 the whole document	1-17
Y	US 2017023599 A1 (RICHARDS WILLIAM L [US] ET AL) 26 January 2017 (2017-01-26) the whole document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/052832

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010129779 A1 (BIO MERIEUX INC [US]; WALSH JOHN [US]; HYMAN JONES [US]) 11 November 2010 (2010-11-11) the whole document	1-17
Y	WO 2013093913 A1 (OPTICUL DIAGNOSTICS LTD [IL]; OPTICUL DIAGNOSTICS INC [US]) 27 June 2013 (2013-06-27) the whole document	1-17
Y	US 2014278136 A1 (SHAMSHEYEVA ALENA [US] ET AL) 18 September 2014 (2014-09-18) the whole document	1-17
Y	WO 2011045544 A2 (BIOMERIEUX SA [FR]; BEAULIEU CORINNE [FR] ET AL.) 21 April 2011 (2011-04-21) the whole document	1-17
Y	WO 2017121964 A1 (BIOFILM CONTROL [FR]) 20 July 2017 (2017-07-20) the whole document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2021/052832

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2012164547	A1	06 December 2012	BR	112013031110	A2	06 December 2016
				CN	103717747	A	09 April 2014
				DK	2714922	T3	27 November 2017
				EP	2714922	A1	09 April 2014
				ES	2652367	T3	01 February 2018
				JP	6587643	B2	09 October 2019
				JP	2014515276	A	30 June 2014
				JP	2017113018	A	29 June 2017
				NO	2714922	T3	17 February 2018
				PL	2714922	T3	28 February 2018
				PT	2714922	T	29 December 2017
				US	2014199703	A1	17 July 2014
				WO	2012164547	A1	06 December 2012
US	2017023599	A1	26 January 2017	NONE			
WO	2010129779	A1	11 November 2010	AU	2010245860	A1	17 November 2011
				BR	PI1015218	A2	14 June 2016
				CA	2760203	A1	11 November 2010
				CN	102460172	A	16 May 2012
				CN	104655840	A	27 May 2015
				EP	2427771	A1	14 March 2012
				JP	5816164	B2	18 November 2015
				JP	2012525850	A	25 October 2012
				US	2010285447	A1	11 November 2010
				US	2014087368	A1	27 March 2014
				US	2016053295	A1	25 February 2016
				WO	2010129779	A1	11 November 2010
WO	2013093913	A1	27 June 2013	CA	2859951	A1	27 June 2013
				CN	104136908	A	05 November 2014
				EA	201400824	A1	30 October 2015
				EP	2795293	A1	29 October 2014
				JP	6204374	B2	27 September 2017
				JP	2015507182	A	05 March 2015
				US	2014377795	A1	25 December 2014
				WO	2013093913	A1	27 June 2013
US	2014278136	A1	18 September 2014	CA	2942815	A1	18 September 2014
				EP	2971055	A1	20 January 2016
				EP	3153588	A2	12 April 2017
				HK	1217970	A1	27 January 2017
				US	2014278136	A1	18 September 2014
				US	2016010138	A1	14 January 2016
				US	2017218426	A1	03 August 2017
				WO	2014145899	A1	18 September 2014
WO	2011045544	A2	21 April 2011	BR	112012008537	A2	29 November 2016
				CN	102656276	A	05 September 2012
				EP	2488660	A2	22 August 2012
				FR	2951548	A1	22 April 2011
				JP	5754742	B2	29 July 2015
				JP	2013508675	A	07 March 2013
				KR	20120102634	A	18 September 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2021/052832

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
					MX	341204	B	11 August 2016
					RU	2012119798	A	20 November 2013
					US	2012264156	A1	18 October 2012
					WO	2011045544	A2	21 April 2011
WO	2017121964	A1	20 July 2017		FR	3046797	A1	21 July 2017
					FR	3046798	A1	21 July 2017
					WO	2017121964	A1	20 July 2017

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2021/052832

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12Q1/04 C12Q1/06 C12Q1/18 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2012/164547 A1 (UNIV DO PORTO [PT]; AZEVEDO PINA VAZ CIDALIA IRENE [PT] ET AL.) 6 décembre 2012 (2012-12-06)	16,17
Y	le document en entier page 2, alinéa 4th - page 9, alinéa 1st; revendications 1-27; figures 1-7 ----- -/--	1-15
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
28 juin 2021		13/07/2021
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Boiangiu, Clara

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SATAWAT SAENTON ET AL: "Evaluation of Different Field-Flow Fractionation Techniques for Separating Bacteria", SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol. 35, no. 11, 10 janvier 2000 (2000-01-10), pages 1761-1775, XP055753735, US ISSN: 0149-6395, DOI: 10.1081/SS-100102492 le document en entier abrégé figure 4 page 1763 - page 1774; figures 2,3 -----	1-17
Y	RESCHIGLIAN P ET AL: "Field-flow fractionation and biotechnology", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 23, no. 9, 1 septembre 2005 (2005-09-01), pages 475-483, XP027778169, ISSN: 0167-7799 [extrait le 2005-09-01] le document en entier abrégé all figures -----	1-17
Y	SHARMA R V ET AL: "Analysis of bacteria in aquatic environments using sedimentation field-flow fractionation: (I) biomass determination", WATER RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 32, no. 5, 1 mars 1998 (1998-03-01), pages 1497-1507, XP027124161, ISSN: 0043-1354 [extrait le 1998-03-01] le document en entier abrégé; figures 1-5; tableaux 1-3 -----	1-17
Y	RESHMI V. SHARMA ET AL: "Physical Characterization and Quantification of Bacteria by Sedimentation Field-Flow Fractionation", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 59, no. 6, 1 janvier 1993 (1993-01-01), pages 1864-1875, XP055753738, US ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.59.6.1864-1875.1993 le document en entier ----- -/--	1-17

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	HOOKEUN LEE AND S KIM RATANATHANAWONGS WILLIAMS ET AL: "Analysis of Whole Bacterial Cells by Flow Field-Flow Fractionation and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry", ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 75, no. 11, 1 juin 2003 (2003-06-01), pages 2746-2752, XP007910557, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/AC020698U [extrait le 2003-05-30] le document en entier -----	1-17
Y	FERNANDEZ RENNY E ET AL: "Review: Microbial analysis in dielectrophoretic microfluidic systems", ANALYTICA CHIMICA ACTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 966, 6 mars 2017 (2017-03-06), pages 11-33, XP029964060, ISSN: 0003-2670, DOI: 10.1016/J.ACA.2017.02.024 le document en entier -----	1-17
Y	KATRI ESKELIN ET AL: "Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation on Virus and Virus-Like Particle Applications", MICROORGANISMS, vol. 7, no. 11, 12 novembre 2019 (2019-11-12), page 555, XP055753719, DOI: 10.3390/microorganisms7110555 le document en entier -----	1-17
Y	CITKOWICZ A ET AL: "Characterization of virus-like particle assembly for DNA delivery using asymmetrical flow field-flow fractionation and light scattering", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 376, no. 2, 15 mai 2008 (2008-05-15), pages 163-172, XP022607155, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/J.AB.2008.02.011 [extrait le 2008-02-19] le document en entier -----	1-17
Y	US 2017/023599 A1 (RICHARDS WILLIAM L [US] ET AL) 26 janvier 2017 (2017-01-26) le document en entier -----	1-17
	-/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 2010/129779 A1 (BIO MERIEUX INC [US]; WALSH JOHN [US]; HYMAN JONES [US]) 11 novembre 2010 (2010-11-11) le document en entier -----	1-17
Y	WO 2013/093913 A1 (OPTICUL DIAGNOSTICS LTD [IL]; OPTICUL DIAGNOSTICS INC [US]) 27 juin 2013 (2013-06-27) le document en entier -----	1-17
Y	US 2014/278136 A1 (SHAMSHYEVA ALENA [US] ET AL) 18 septembre 2014 (2014-09-18) le document en entier -----	1-17
Y	WO 2011/045544 A2 (BIOMERIEUX SA [FR]; BEAULIEU CORINNE [FR] ET AL.) 21 avril 2011 (2011-04-21) le document en entier -----	1-17
Y	WO 2017/121964 A1 (BIOFILM CONTROL [FR]) 20 juillet 2017 (2017-07-20) le document en entier -----	1-17

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/IB2021/052832

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2012164547 A1	06-12-2012	BR 112013031110 A2 CN 103717747 A DK 2714922 T3 EP 2714922 A1 ES 2652367 T3 JP 6587643 B2 JP 2014515276 A JP 2017113018 A NO 2714922 T3 PL 2714922 T3 PT 2714922 T US 2014199703 A1 WO 2012164547 A1	06-12-2016 09-04-2014 27-11-2017 09-04-2014 01-02-2018 09-10-2019 30-06-2014 29-06-2017 17-02-2018 28-02-2018 29-12-2017 17-07-2014 06-12-2012
US 2017023599 A1	26-01-2017	AUCUN	
WO 2010129779 A1	11-11-2010	AU 2010245860 A1 BR PI1015218 A2 CA 2760203 A1 CN 102460172 A CN 104655840 A EP 2427771 A1 JP 5816164 B2 JP 2012525850 A US 2010285447 A1 US 2014087368 A1 US 2016053295 A1 WO 2010129779 A1	17-11-2011 14-06-2016 11-11-2010 16-05-2012 27-05-2015 14-03-2012 18-11-2015 25-10-2012 11-11-2010 27-03-2014 25-02-2016 11-11-2010
WO 2013093913 A1	27-06-2013	CA 2859951 A1 CN 104136908 A EA 201400824 A1 EP 2795293 A1 JP 6204374 B2 JP 2015507182 A US 2014377795 A1 WO 2013093913 A1	27-06-2013 05-11-2014 30-10-2015 29-10-2014 27-09-2017 05-03-2015 25-12-2014 27-06-2013
US 2014278136 A1	18-09-2014	CA 2942815 A1 EP 2971055 A1 EP 3153588 A2 HK 1217970 A1 US 2014278136 A1 US 2016010138 A1 US 2017218426 A1 WO 2014145899 A1	18-09-2014 20-01-2016 12-04-2017 27-01-2017 18-09-2014 14-01-2016 03-08-2017 18-09-2014
WO 2011045544 A2	21-04-2011	BR 112012008537 A2 CN 102656276 A EP 2488660 A2 FR 2951548 A1 JP 5754742 B2 JP 2013508675 A KR 20120102634 A MX 341204 B RU 2012119798 A US 2012264156 A1 WO 2011045544 A2	29-11-2016 05-09-2012 22-08-2012 22-04-2011 29-07-2015 07-03-2013 18-09-2012 11-08-2016 20-11-2013 18-10-2012 21-04-2011

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/IB2021/052832

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2017121964 A1	20-07-2017	FR 3046797 A1	21-07-2017
		FR 3046798 A1	21-07-2017
		WO 2017121964 A1	20-07-2017