

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

①1 N° de publication : **3 108 917**

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

②1 N° d'enregistrement national : **20 03429**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **C 12 Q 1/18** (2019.12), G 01 N 30/00, G 01 N 15/00,  
G 01 N 33/49

⑫

## BREVET D'INVENTION

**B1**

⑤4 Recherche de résistance aux antimicrobiens par la méthode de Fractionnement par Couplage Flux-Force.

②2 Date de dépôt : 06.04.20.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public  
de la demande : 08.10.21 Bulletin 21/40.

④5 Date de la mise à disposition du public du  
brevet d'invention : 11.11.22 Bulletin 22/45.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : *Université de Limoges  
Etablissement public national à caractère scientifique  
culturel et professionnel — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : Battu Serge, Bégaud Gaëlle,  
Delabassée Sylvie, Barraud Olivier, Duval Raphaël et  
Cardot Philippe.

⑦3 Titulaire(s) : Université de Limoges Etablissement  
public national à caractère scientifique culturel et  
professionnel.

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Chaillot.

**FR 3 108 917 - B1**



## 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 (Asymmetrical 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.
- [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 fractionnement 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  $\mu\text{m}$ , 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  $R_{Obs} = P\Delta R$ ; significatif d'un effet biologique soit le pourcentage de variation du facteur de rétention

[0051] [Math.1]

$$P\Delta R = \frac{|\Delta R_{Obs}|}{R_{ObsTémoin}} \times 100$$

[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  $P\Delta R <$  au seuil de significativité, alors le micro-organisme est considéré comme résistant. Si la valeur mesurée de  $P\Delta R >$  au seuil de significativité, alors le micro-organisme est considéré comme sensible.

[0054] A titre d'exemple,  $P\Delta R$  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 parallélépipédique 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 définie la longueur et la largeur du canal. L'épaisseur de la feuille de mylar définit elle l'épaisseur du canal (125 à 350  $\mu\text{m}$  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] 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.
- [0069] 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.
- [0070] 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.

- [0071] 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 :
- [0072] – 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.
- [0073] 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.
- [0074] Sur ces figures :
- [0075] [fig.1] représente le schéma analytique de mesure de la résistance à un antibiotique selon la mise en œuvre de l'Exemple 1.
- [0076] [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.
- [0077] [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.
- [0078] [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.
- [0079] [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.
- [0080] [fig.4] représente le schéma analytique de mesure de la résistance à un antibiotique selon la mise en œuvre de l'Exemple 2.
- [0081] [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.
- [0082] [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).
- [0083] 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 ré-

sistance à l'antimicrobien sont attendus à compter de 40 heures après la mise en culture de l'échantillon sur gélose.

- [0084] 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.
- [0085] 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.
- [0086] 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  $P\Delta R = 13,9\%$ .
- [0087] 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.
- [0088] 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.

[0089] A cette concentration, la souche est résistante à l'antimicrobien.

[0090] D'une manière similaire, si l'on se réfère à la Figure 5B, les profils d'éluion 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.

[0091] 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.

[0092]

## **EXEMPLES**

[0093] *Matériels & Méthodes*

[0094] 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 séparation, 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.

[0095] Milieu de culture: Difco™ Mueller Hinton Broth (Becton Dickinson, référence 275730)

[0096] Souches bactériennes utilisées : *E.coli* 25922 et 35218 (ATCC, Manassas, VA,

USA).

[0097] 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).

[0098] *Conditions de culture*

[0099] 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.

[0100] Après 2h d'incubation, le milieu de culture a été centrifugé puis repris dans un volume de 0,5 mL de PBS.

[0101] *Exemple de calcul du pourcentage de variation de Robs:*

[0102] Selon les manipulations reproduites en [fig.5], le calcul du pourcentage de variation du facteur de rétention ou PAR s'effectue comme suit :

[0103] [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	2,8589932	0,352	12,70%
				4 mg/ml		2,3801177	0,408	
				8 mg/ml		2,8589932	0,352	
E. coli 25922	Ampicilline	Sensible	4mg/ml	0 (Témoin)	0,962	2,1748959	0,442	22,30%
				4 mg/ml		3,7338757	0,257	
				8 mg/ml		3,5787397	0,289	
E. coli 35218	Ampicilline	Résistant	4mg/ml	0 (Témoin)	0,962	2,7288757	0,257	4,50%
				4 mg/ml		3,5787397	0,289	
				8 mg/ml		3,5787397	0,289	
E. coli 35218	Ampicilline	Résistant	4mg/ml	0 (Témoin)	0,962	3,5787397	0,274	6,69%
				4 mg/ml				
				8 mg/ml				

[0104] [Math 2] 
$$PAR = \frac{|R_{ObsTémoin} - R_{Obstraité}|}{R_{ObsTémoin}} \times 100 = \frac{|\Delta R_{Obs}|}{R_{ObsTémoin}} \times 100 ;$$

[0105] 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 résistance des souches d'*E.coli* 25922 et 35218 vis-à-vis de l'Ampicilline

[0106] 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.

[0107] 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]).

[0108] 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.

[0109] Les conditions de base ont été établies de la manière suivante :

- [0110] – Débit de phase mobile : 1,2 mL/min ;
- Champ multigravitationnel : 20g ;
- Stop-flow : 2 min.

[0111] Avec ces conditions, il a été possible d'obtenir une réponse après seulement 1 heure d'incubation.

[0112] 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.

[0113] Sur ces figures, on observe en ce qui concerne le pic d'éluion des bactéries une diminution du facteur de rétention =  $R_{\text{obs}} = t_0/\text{tr}_n$ , caractéristique de l'induction de l'événement biologique lié à l'incubation en présence d'antibactériens.

[0114] 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.

[0115] 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.

[0116] Classiquement, la réalisation d'un antibiogramme se fait à partir de colonies bactériennes 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.

[0117] 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).

[0118] Il a ainsi été possible de confirmer la variation dose-dépendante du facteur  $R_{\text{obs}}$  pour un antibiotique, sur différentes souches (sensibles/résistantes) de bactéries *E.coli*.

[0119] La différence de comportement de la souche bactérienne est mise en évidence par la mesure de  $R_{\text{obs}}$ , 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.

[0120] La résistance à l'antimicrobien est mesuré par comparaison de PΔR au seuil de significativité, PΔR s'exprime selon la formule ci-après :

$$[0121] \quad \text{Considérant le } P\Delta R = \frac{|\Delta R_{\text{Obs}}|}{R_{\text{ObsTémoin}}} \times 100 \quad ,$$

[0122] si la valeur mesurée PΔR < seuil de significativité; alors le micro-organisme est considéré comme résistant.

[0123] D'une manière similaire, si la valeur mesurée PΔR > seuil de significativité; alors le micro-organisme est considéré comme sensible.

[0124] 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.

[0125] 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.

[0126] 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.

[0127] 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-

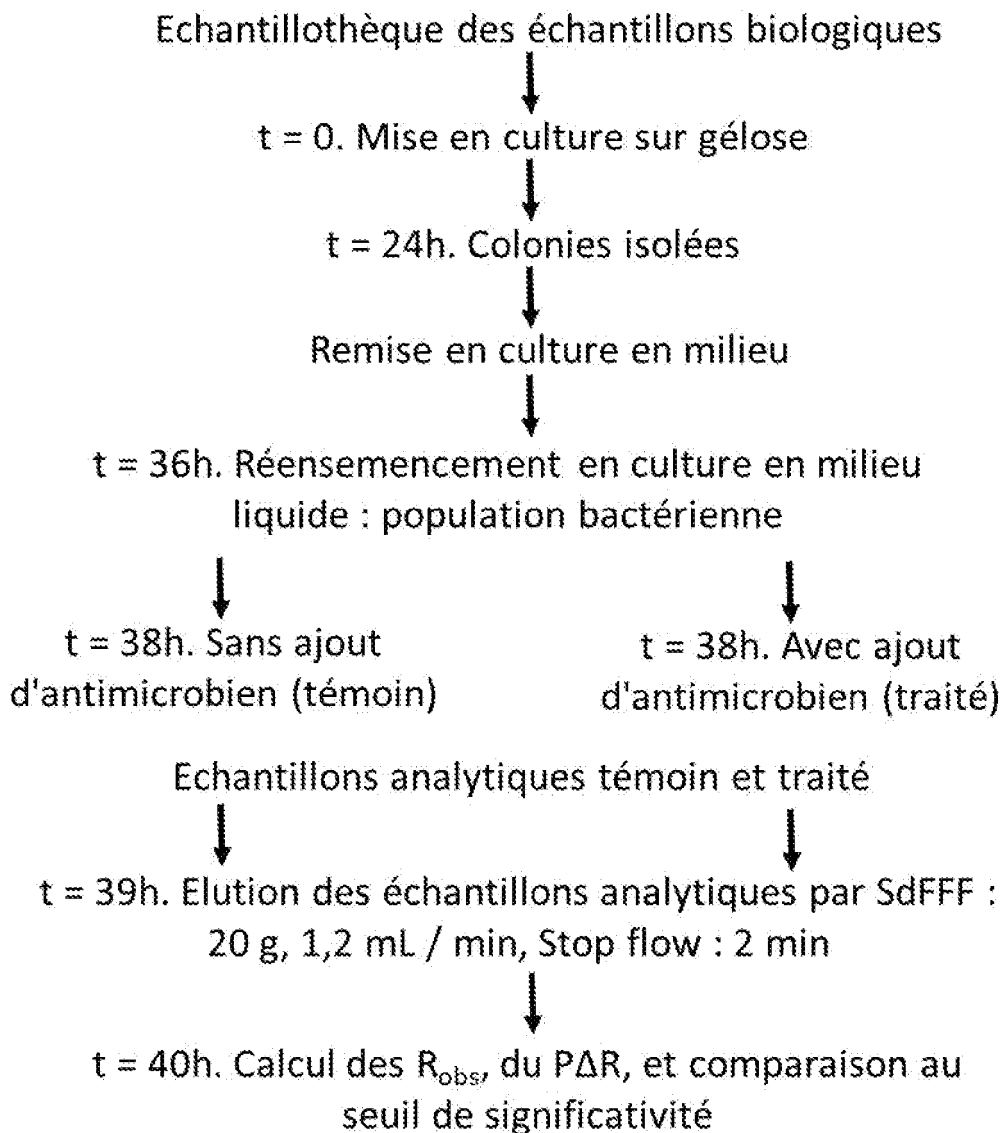
dications 1 à 11, dans lequel le dispositif de fractionnement par couplage flux-force est un dispositif de fractionnement par couplage flux-force de type multigravitationnel.

- [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,  $R_{obs} = t_{rn}/t_0$  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 ;
  - au moins un canal de séparation ;
  - facultativement au moins un composant choisi parmi 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

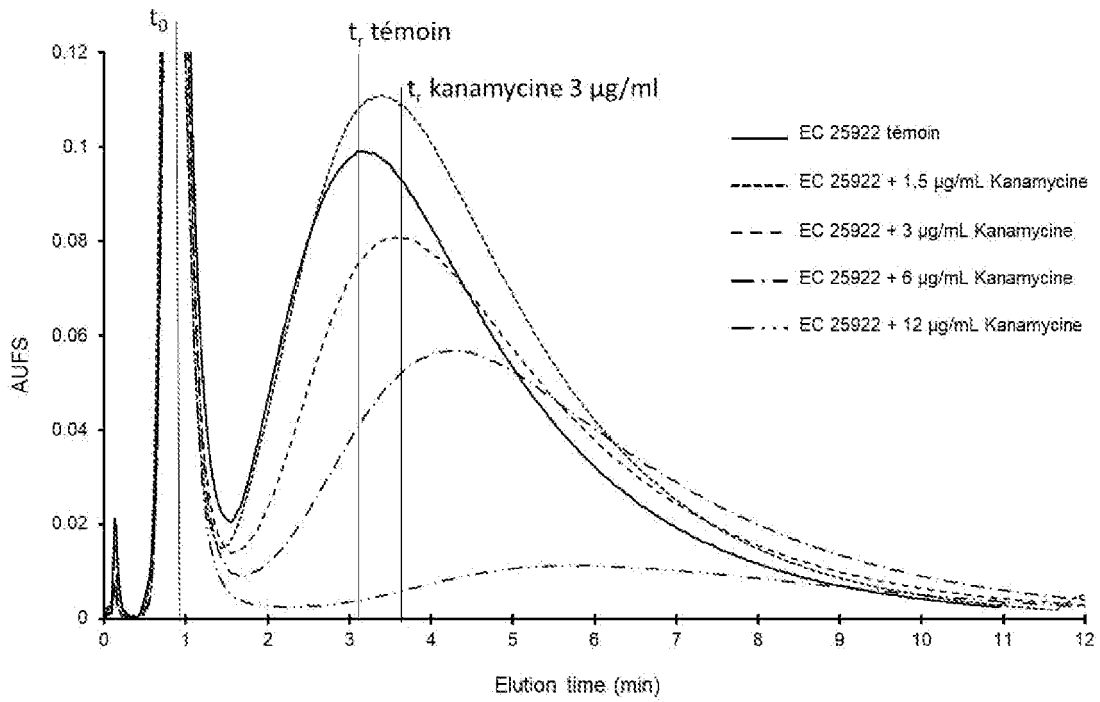
SdFFF comprenant :

- 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.

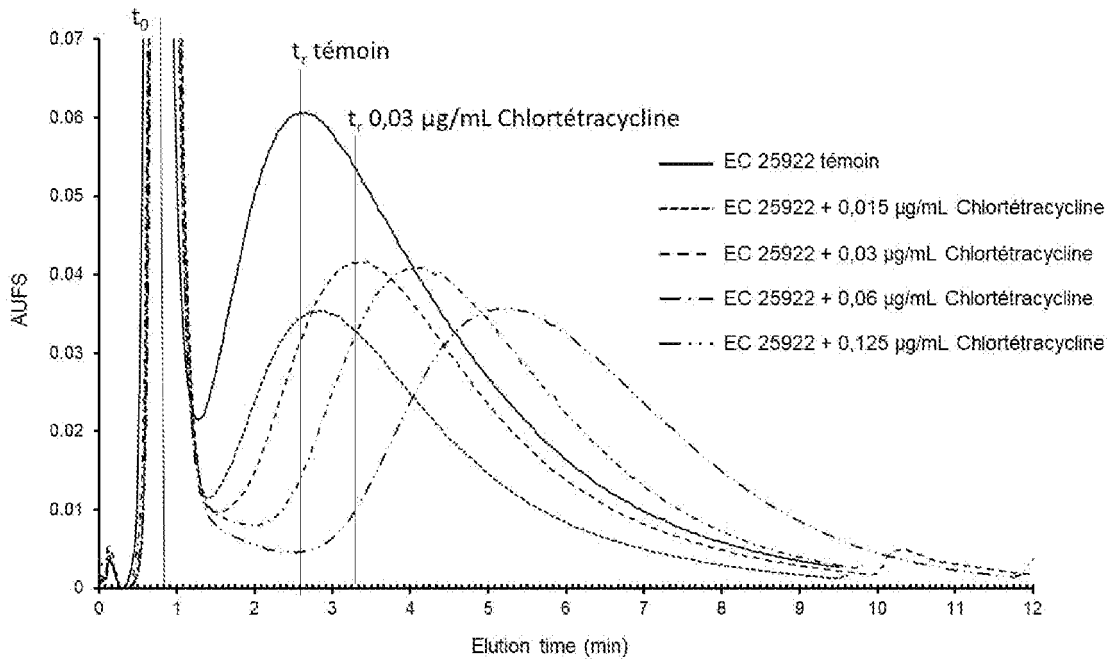
[Fig. 1]



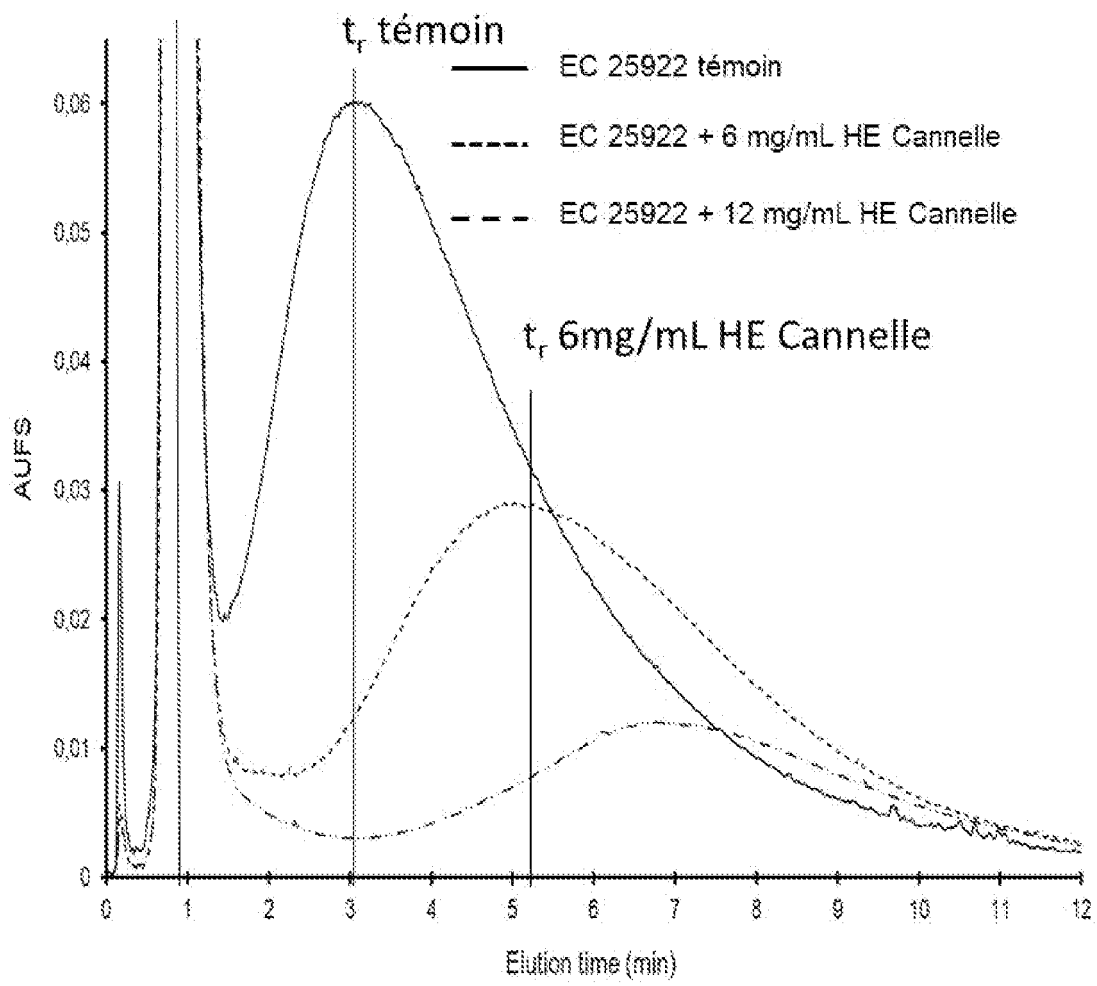
[Fig. 2]



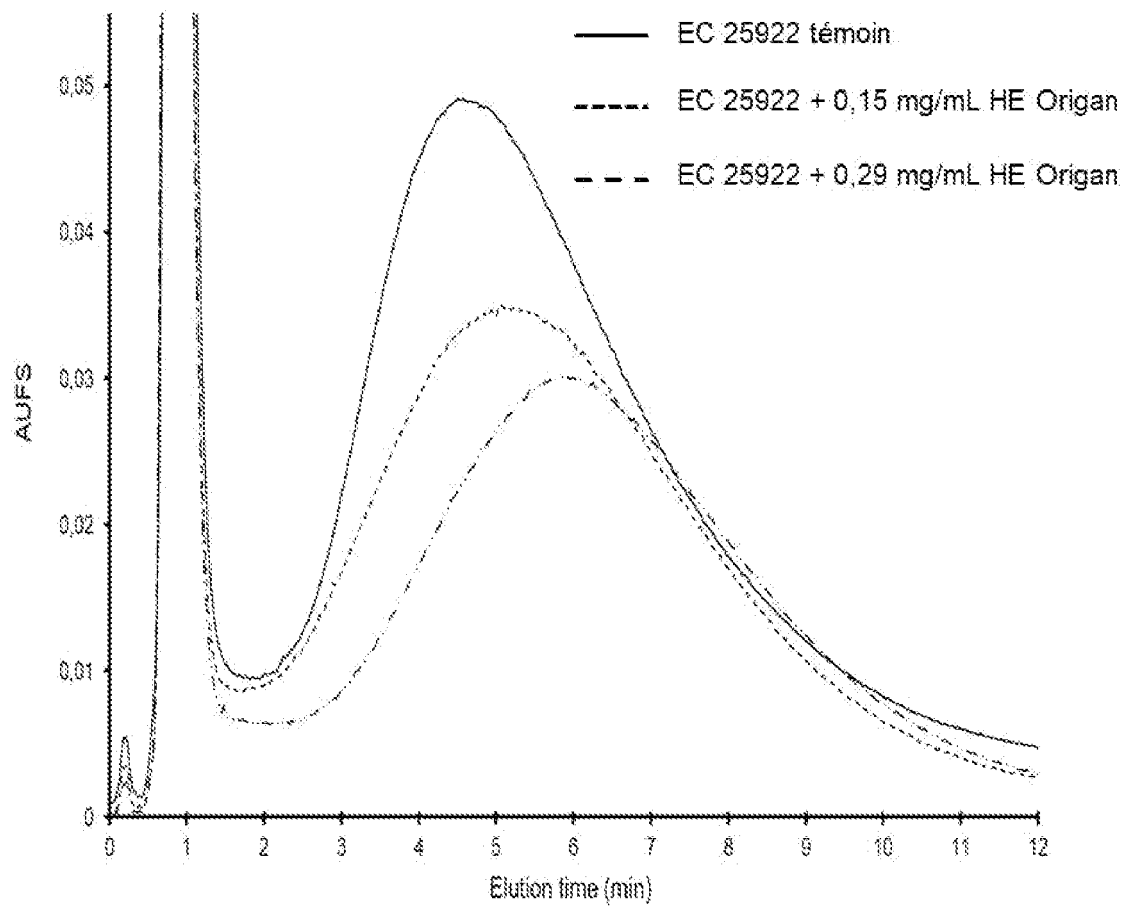
[Fig. 3A]



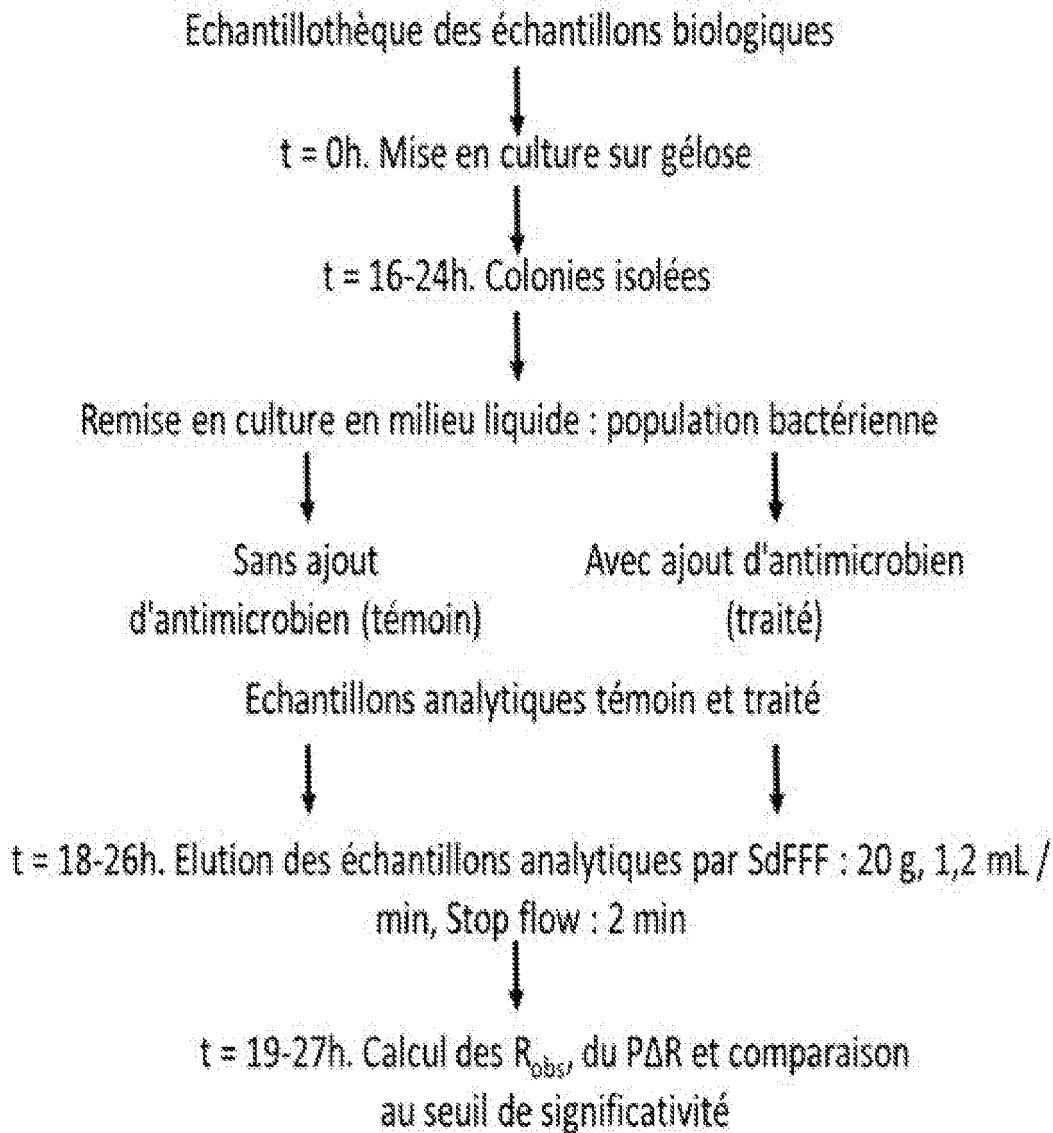
[Fig. 3B]



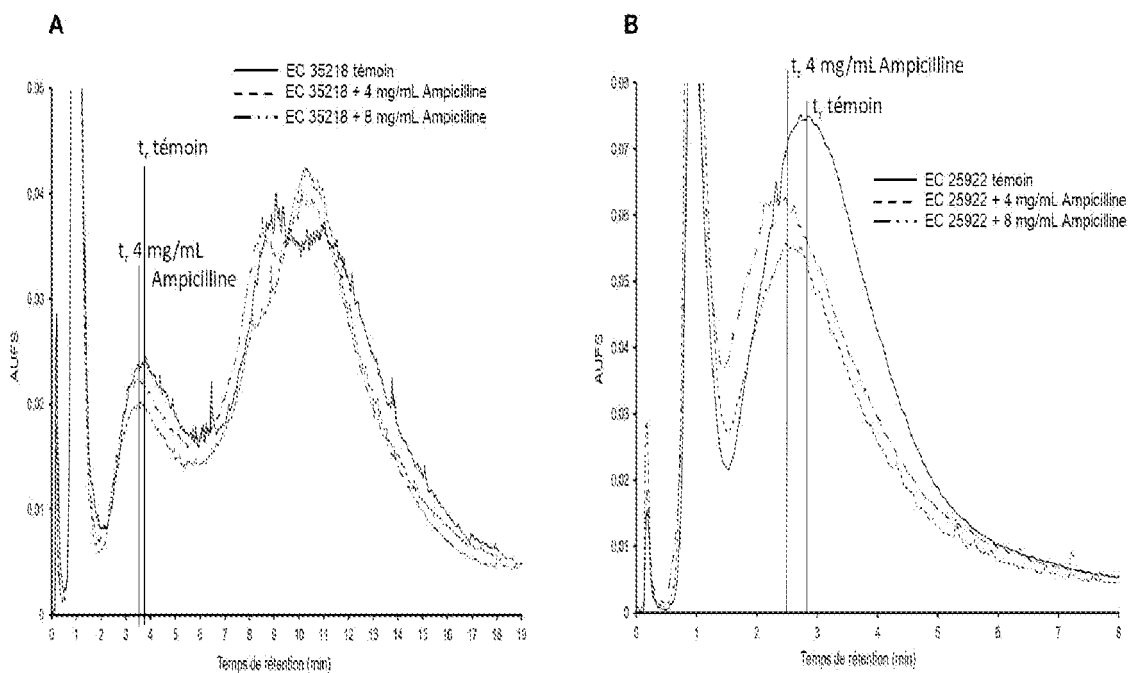
[Fig. 3C]



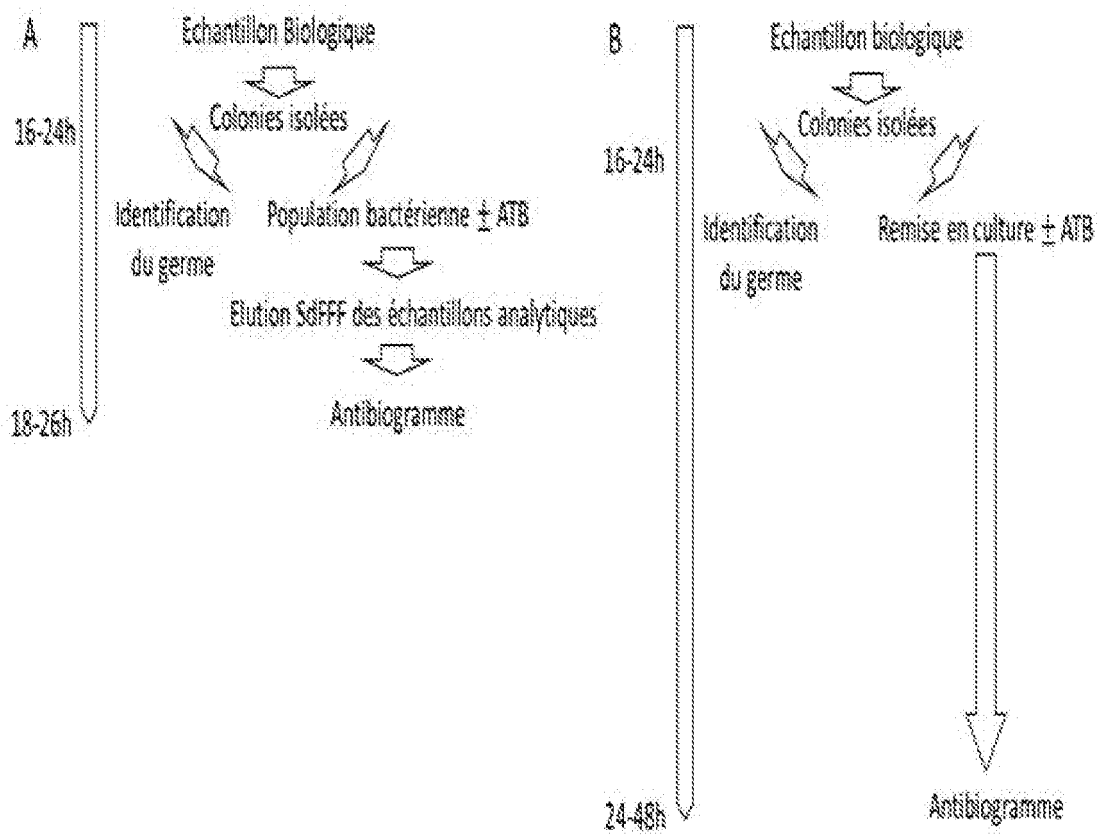
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



# RAPPORT DE RECHERCHE

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

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

---

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

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

## CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

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

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

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

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

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

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

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

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

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

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

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

WO 2012/164547 A1 (UNIV DO PORTO [PT];  
AZEVEDO PINA VAZ CIDALIA IRENE [PT] ET  
AL.) 6 décembre 2012 (2012-12-06)

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

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]

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]

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

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]

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

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

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]

US 2017/023599 A1 (RICHARDS WILLIAM L [US]  
ET AL) 26 janvier 2017 (2017-01-26)

WO 2010/129779 A1 (BIO MERIEUX INC [US];  
WALSH JOHN [US]; HYMAN JONES [US])  
11 novembre 2010 (2010-11-11)

WO 2013/093913 A1 (OPTICUL DIAGNOSTICS LTD  
[IL]; OPTICUL DIAGNOSTICS INC [US])  
27 juin 2013 (2013-06-27)

US 2014/278136 A1 (SHAMSHEYEVA ALENA [US]  
ET AL) 18 septembre 2014 (2014-09-18)

WO 2011/045544 A2 (BIOMERIEUX SA [FR];  
BEAULIEU CORINNE [FR] ET AL.)

21 avril 2011 (2011-04-21)

WO 2017/121964 A1 (BIOFILM CONTROL [FR])

20 juillet 2017 (2017-07-20)

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

NEANT

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

NEANT