

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 13.09.01.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 14.03.03 Bulletin 03/11.

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

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : HEMOSYSTEM Société anonyme —
FR.

⑦② Inventeur(s) : HERMET JEAN PIERRE, BESSON
FAURE ISABELLE, MONNOT DES ANGLES ANNE et
GODFRIN YANN.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : BREESE MAJEROWICZ SIMONNOT.

⑤④ PROCÉDE DE CONCENTRATION ET DE DETECTION DE GERMES PATHOGENES A PARTIR DE PRODUITS
SANGUINS ET/OU DE LEURS DERIVES ET DISPOSITIF POUR LE METTRE EN OEUVRE.

⑤⑦ La présente invention a pour objet une méthode de
concentration de germes pathogènes éventuellement pré-
sents dans les produits sanguins ou dérivés, ainsi que la dé-
tection desdits germes ainsi concentrés pour effectuer un
contrôle de la pathogénicité desdits produits sanguins com-
prenant les étapes suivantes, (a) on soumet un échantillon
dudit produit sanguin à un traitement d'agrégation des cel-
lules sanguines, (b) on élimine les agrégats formés à l'étape
(a) par passage de l'échantillon traité sur un premier filtre
laissant passer les germes contaminants mais pas les agré-
gats de cellules, (c) on lyse sélectivement les cellules rési-
duelles du filtrat obtenu à l'étape (b), (d) on récupère les
germes contaminants par passage du lysat de l'étape (c)
sur un second filtre laissant passer les débris cellulaires, et
dans le cas d'une détection, (e) on analyse le second filtre
pour détecter les germes contaminants éventuellement re-
tenus.

L'invention a aussi pour objet un dispositif pour la con-
centration et le marquage des germes contaminants éven-
tuellement présents dans un produit sanguin, susceptible
d'être mis en oeuvre dans le procédé de détection de ger-
mes pathogènes de l'invention.



PROCEDE DE CONCENTRATION ET DE DETECTION DE
GERMES PATHOGENES A PARTIR DE PRODUITS SANGUINS ET/OU DE
LEURS DERIVES ET DISPOSITIF POUR LE METTRE EN OEUVRE .

5 La présente invention a pour objet une méthode
de concentration de germes pathogènes éventuellement
présents dans les produits sanguins ou dérivés, ainsi que
la détection desdits germes ainsi concentrés pour effectuer
un contrôle de la pathogénicité desdits produits sanguins.

10

 On entend par produit sanguin tant le sang
total, comme toute préparation issue du fractionnement de
celui-ci, comprenant ou non des composants cellulaires, à
titre d'exemple, on entend par produit sanguin les
15 concentrés des globules rouges ou de plaquettes, mais aussi
les préparations plasmatiques ou sériques.

 La détection de contaminations des produits
sanguins et dérivés par différents germes pathogènes, tels
20 que des bactéries, des virus, des moisissures, des levures
ou autres, est l'une des grandes difficultés auxquelles
sont confrontées de nos jours les autorités responsables de
la santé publique, ainsi que les industries de la
transfusion sanguine.

25

 Des tests de détection existent, mais ils ne
sont pas utilisables en routine à ce jour.

 Les principales difficultés présentées par la
plupart des tests de détection de tels germes pathogènes,
30 parmi une population ou une sous-population de cellules
sanguines, réside dans le fait que la plupart de
traitements censés extraire sélectivement les germes

pathogènes, provoquent simultanément une élimination de ceux-ci.

5 Cette élimination conduit presque systématiquement à une sous-évaluation de la présence desdits germes dans le produit sanguin testé, et donc à une augmentation du risque sanitaire.

10 La demanderesse a donc conçu une nouvelle méthode rapide et sensible pour détecter une contamination d'un produit sanguin ou dérivé, par de tels germes pathogènes.

Le procédé selon l'invention est remarquable en ce qu'il est réalisé directement sur un échantillon issu d'un produit sanguin prélevé chez un sujet, sans traitement ou dilution préliminaire.

15 Le procédé de détection de germes pathogènes développée par la Demanderesse consiste essentiellement à concentrer sélectivement lesdits germes pathogènes, puis à les détecter, une fois concentrés, par des techniques connues de l'homme du métier.

20 La concentration sélective des germes pathogènes est effectuée par élimination séquentielle ou simultanée des différentes populations de cellules sanguines présentes dans un échantillon d'un produit sanguin.

25 Le procédé de concentration de germes pathogènes selon l'invention comporte une première étape de concentration des germes pathogènes consistant à réduire la concentration des populations des cellules sanguines au moyen d'une agrégation sélective de celles-ci, suivie d'une
30 filtration afin de recueillir dans le filtrat les germes pathogènes concentrés non agrégés et de retenir sur le filtre les agrégats de cellules sanguines.

On entend par agrégation, au sens de la présente invention, toute action conduisant à la formation d'agrégats cellulaires, et on entend par agrégat cellulaire tout groupement de cellules comportant plus de deux
5 cellules et dont la taille est supérieure à celle d'une cellule isolée. Au sens de la présente invention, un agrégat peut être obtenu soit par agrégation, telle que l'agrégation des plaquettes subséquente à leur activation, une agglutination, telle que l'agglutination des globules
10 rouges obtenue lors que ceux-ci se trouvent en présence de molécules spécifiques, comme les lectines érythrospécifiques, soit un rapprochement des cellules induit par un changement de la charge électrostatique de leurs membranes ou encore d'autres mécanismes d'adhésion ou
15 de rapprochement cellulaire conduisant au regroupement de plus de deux cellules.

Selon des modes de mise en œuvre préférés, l'agrégation des différentes populations de cellules
20 sanguines peut être effectuée à l'aide de composés induisant l'agrégation plaquettaire, ou bien à l'aide de composés induisant l'agglutination spécifique des globules rouges.

On connaît par exemple que, en présence de
25 certains composés, les plaquettes ont la capacité de s'agréger. Ces agrégats peuvent être facilement séparés des germes pathogènes par filtration.

Les globules rouges présentent également
30 quelques propriétés d'agglutination.

Le procédé de concentration de germes pathogènes selon l'invention comporte une deuxième étape de

réduction de la concentration des populations des cellules majoritaires dans le sang, à savoir les plaquettes et les globules rouges, consistant à lyser les cellules isolées non agrégées lors de la première étape d'agrégation.

5

Cette deuxième étape de réduction de la concentration des populations des cellules sanguines permet une réduction de l'ordre de 4 log (depuis 10^9 à 10^5 cellules/ml) en ce qui concerne la concentration des plaquettes et de l'ordre de 5 log (depuis 10^{10} à 10^5) en ce qui concerne la concentration des globules rouges. La récupération des bactéries à l'issue de cette deuxième étape est supérieure à 50%.

15

Plus précisément l'invention a pour objet un procédé de concentration de germes contaminants éventuellement présents dans un produit sanguin comprenant des cellules sanguines, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

20

a) on soumet un échantillon dudit produit sanguin à un traitement d'agrégation des cellules sanguines,

25

b) on élimine les agrégats formés à l'étape (a) par passage de l'échantillon traité sur un premier filtre laissant passer les germes contaminants mais pas les agrégats de cellules,

30

c) on lyse sélectivement les cellules résiduelles du filtrat obtenu à l'étape (b),

d) on récupère les germes contaminants par passage du lysat de l'étape (c) sur un second filtre laissant passer les débris cellulaires.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention comprend une étape supplémentaire d'analyse du second filtre pour détecter les germes contaminants éventuellement retenus.

5

Avantageusement le procédé de détection selon l'invention comprend l'addition d'un agent de marquage des germes contaminants, soit lors de l'agrégation de l'étape (a), soit lors de la lyse de l'étape (c), soit directement sur le deuxième filtre lors de l'étape (e) d'analyse.

10

A titre d'exemple d'agent de marquage des germes pathogènes détectables par le procédé de l'invention, on peut citer une solution de marquage comprenant un substrat estérasique tel que le ChemChrome V6.

15

Aussi, en tant d'agent de marquage des germes pathogènes détectables par le procédé de l'invention, on peut utiliser une solution de marquage comprenant un anticorps marqué ou un marqueur d'acides nucléiques. Préférentiellement, le marqueur sera fluorescent ou couplé à un fluorochrome, éventuellement la fluorescence sera détectée par une excitation laser.

20

Selon un mode particulier de mise en œuvre du procédé de l'invention, les cellules sanguines du produit sanguin sont des plaquettes ou des globules rouges ou un mélange de ceux-ci.

25

Selon un autre mode particulier de mise en œuvre du procédé de l'invention, les cellules sanguines du produit sanguin sont des plaquettes et le traitement d'agrégation de l'étape (a) comprend la mise en contact de

30

l'échantillon avec une composition d'agrégation comprenant au moins l'un des agents d'agrégation choisis dans le groupe comprenant :

5 - un anticorps spécifique d'un antigène plaquettaire,

 - un agoniste fort de l'activation plaquettaire choisi parmi : la thrombine, le TRAP (thrombin receptor activating peptide), la trypsine, le collagène, le thromboxane A₂, le PAF (platelet activating factor), le
10 ionophore A23187.

 - un agoniste faible de l'activation plaquettaire choisi parmi ADP, adrénaline, acide arachidonique, facteur Von Willebrand, sérotonine ou épinéphrine.

15

Avantageusement la concentration en anticorps de type CD9 spécifique d'un antigène plaquettaire dans la composition d'agrégation est comprise entre 0,5 µg/ml et 50 µg/ml, et de préférence elle est comprise entre 1 µg/ml et
20 10 µg/ml.

Encore avantageusement la concentration en agoniste fort dans la composition d'agrégation est comprise entre :

25 - 0,5 UI/ml et 100 UI/ml et de préférence entre 1 UI/ml et 20 UI/ml pour un agoniste de type thrombine,

 - 5 µM et 200 µM et de préférence entre 10 et 100 µM pour un agoniste de type TRAP,

 - 1 nM et 500 nM et de préférence entre 10 nM
30 et 300 nM pour un agoniste de type trypsine,

 - 0,05 µg/ml et 50 µg/ml et de préférence entre 1 µg/ml et 20 µg/ml pour un agoniste de type collagène,

- 0,01 $\mu\text{g/ml}$ et 5 $\mu\text{g/ml}$ et de préférence entre 0,1 et 1 $\mu\text{g/ml}$ pour un agoniste du type thromboxane A₂,

- 0,005 mg/ml et 1 mg/ml et de préférence entre 0,05 et 0,5 mg/ml pour un agoniste du type PAF,

5 - 0,1 μM et 100 μM et de préférence entre 1 μM et 20 μM pour un agoniste du type ionophore A23187.

Avantageusement la concentration en agoniste faible dans la composition d'agrégation est comprise
10 entre :

- 0,5 μM et 100 μM et de préférence entre 1 μM et 20 μM pour un agoniste du type ADP, du type adrénaline ou du type épinéphrine.

- 0,001 mM et 10 mM et de préférence entre 0,01 et 5 pour un agoniste du type acide arachidonique,
15

- 0,001 mg/ml et 1 mg/ml et de préférence entre 0,01 mg/ml et 0,5 mg/ml pour un agoniste du type facteur Von Willebrand,

- 0,05 μM et 100 μM et de préférence entre 0,01 μM et 50 μM pour un agoniste du type sérotonine.
20

D'une manière tout à fait préférentielle l'anticorps spécifique d'un antigène plaquettaire, est choisi parmi : un anticorps anti-CD9, CD32, anti-PTA1, CD42, anti-GpIIb/IIIa ou anti-GpIV.
25

Selon un autre mode particulier de mise en œuvre du procédé de l'invention le produit sanguin comprend des globules rouges et le traitement d'agrégation de l'étape (a) comprend la mise en contact de l'échantillon avec une composition d'agglutination comprenant au moins un agent d'agglutination choisi parmi les lectines.
30

Avantageusement lesdites lectines présentent une activité érythroagglutinine.

5 Tout préférentiellement les lectines sont choisies parmi les lectines de *Phaseolus vulgaris*, *Vicia sativa*, *Vicia faba*, *Erythrina corallodendron*, etc...

10 Avantageusement la concentration de lectine de type *Phaseolus vulgaris* dans la composition d'agglutination est comprise entre 10 $\mu\text{g/ml}$ et 200 $\mu\text{g/ml}$.

15 Avantageusement, la lyse des cellules de l'étape (c) est réalisée avec une solution de lyse comprenant un ou plusieurs détergents choisis dans le groupe comprenant : saponine, SDS, Tween 20, Triton X100, Brij 96, Polidocanol, ou Carbonate de sodium.

20 De préférence, la solution de lyse est constituée d'un mélange de saponine, de TRITON X100 et de TWEEN 20, et tout préférentiellement la solution de lyse comprend de la saponine à une concentration comprise entre 0,005 % et 0,5 %, du TRITON X100 à une concentration comprise entre 0,001 % et 0,5 % du TWEEN 20 à une concentration comprise entre 0,01 % et 1%.

25 De préférence, les germes contaminants des produits sanguins, capables d'être concentrés selon le procédé de l'invention sont choisis parmi le groupe des bactéries aérobies ou anaérobies, des moisissures, des
30 levures, des spores de bactéries vivantes et/ou mortes.

Avantageusement la taille des pores du premier filtre mis en œuvre dans le procédé de l'invention est comprise entre 2 μm et 20 μm .

5 Avantageusement la taille des pores du second filtre mis en œuvre dans le procédé de l'invention est comprise entre 0,2 μm et 2 μm .

10 Tout préférentiellement, les germes
contaminants capables d'être concentrés selon le procédé de l'invention, sont choisis parmi le groupe des bactéries aérobies ou anaérobies, des moisissures, des levures ou des spores de bactéries vivantes et/ou mortes, la taille des pores du premier filtre est comprise entre 2 μm et 20 μm ,
15 et la taille des pores du second filtre est comprise entre 0,2 μm et 2 μm .

Avantageusement la détection des germes contaminants de l'étape (e) du procédé de l'invention est
20 réalisée dans un dispositif clos.

L'invention a aussi pour objet un dispositif pour la concentration et le marquage des germes contaminants éventuellement présents dans un produit
25 sanguin comprenant des cellules sanguines, susceptible d'être mis en œuvre dans le procédé de détection de germes pathogènes de l'invention comprenant:

 - un premier réservoir (1) étanche et stérile contenant au moins un agent d'agrégation de cellules
30 sanguines et éventuellement au moins un agent de marquage de germes pathogènes,

 - un deuxième réservoir (2) étanche et stérile contenant au moins un agent de lyse de cellules sanguines

et éventuellement au moins un agent de marquage de germes pathogènes,

5 - un premier filtre (3) placé entre le premier et le deuxième réservoir capable de retenir les agrégats formés dans ledit premier réservoir,

 - un deuxième filtre (4) placé en aval du deuxième réservoir capable de retenir les éventuels germes pathogènes contaminants,

10 - des moyens de connexion (5) étanches et stériles placés, entre le premier réservoir (1) et le premier filtre (3), entre le premier filtre (3) et le deuxième réservoir (2) et entre le deuxième réservoir (2) et le deuxième filtre (4).

15 Selon un mode de mise en œuvre préféré, le dispositif de l'invention comprend des moyens de connexion (6) étanches et stériles pour relier la poche contenant le produit sanguin au premier réservoir (1) stérile.

20 Avantageusement, la connexion (6) étanche et stérile reliant la poche contenant le produit sanguin au premier réservoir stérile est munie d'une valve anti-retour (7).

25 Selon un autre mode de réalisation préférée, le dispositif de l'invention comprend des moyens d'échantillonnage d'un volume déterminé du produit sanguin directement à partir d'une poche de stockage dudit produit vers ledit premier réservoir (1).

30 Avantageusement, le premier réservoir (1) étanche et stérile du dispositif de l'invention est muni d'un système d'aspiration (8) de l'échantillon, et de préférence ledit système d'aspiration est un piston.

Selon un autre mode de mise en œuvre préféré, le deuxième filtre (4) du dispositif de l'invention est inclus dans un support de membrane composé de deux parties pouvant être dissociées permettant de récupérer ledit filtre.

Avantageusement le dispositif de l'invention est clos et stérile.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent et des figures en annexe dans lesquelles :

- la figure 1 illustre le dénombrement des plaquettes après avoir mis en contact les concentrés plaquettaires avec différentes concentrations de thrombine.

- La figure 2 illustre l'agrégation des plaquettes en présence d'ADP.

- La figure 3 montre le dénombrement des plaquettes en présence d'anticorps CD9.

- La figure 4 montre la courbe dose réponse obtenue en présence de concentrations croissantes d'anticorps CD9

- La figure 5 illustre l'agglutination de globules rouges en présence de la lectine *Phaseolus vulgaris* utilisée à une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$

- La figure 6 montre les effets de la solution de lyse sur la récupération de différents germes pathogènes dans des cultures pures.

- La figure 7 montre l'effet de la solution de lyse sur différents échantillons de plaquettes.

- La figure 8 illustre l'effet de la lyse sur deux échantillons différents de concentrés de globules rouges.

- La figure 9 illustre une mise en œuvre particulière du dispositif de concentration des germes pathogènes de l'invention, comprenant:

- un premier réservoir (1) étanche et stérile,
- 5 - un deuxième réservoir (2) étanche et stérile,
- un premier filtre stérile (3) placé entre le premier réservoir (1) et le deuxième réservoir (2),
- un deuxième filtre stérile (4) placé en aval du deuxième réservoir (2)
- 10 - des moyens de connexion (5) étanches et stériles placés, entre le premier réservoir (1) et le premier filtre (3), entre le premier filtre (3) et le deuxième réservoir (2) et entre le deuxième réservoir (2) et le deuxième filtre (4).
- 15 - des moyens de connexion (6) étanches et stériles pour relier la poche contenant le produit sanguin au premier réservoir (1).
- une valve anti-retour (7) placée dans la connexion (6) reliant la poche contenant le produit sanguin
- 20 au premier réservoir 1.
- un système d'aspiration de l'échantillon (8).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. CONCENTRATION DE GERMES PATHOGENES AU MOYEN 25 D'UNE ETAPE D'AGREGATION

I.1 Agrégation des plaquettes.

Exemple 1 . Agrégation avec un agoniste fort:
la thrombine.

30 La thrombine est un agoniste fort de l'agrégation plaquettaire.

Dans les travaux expérimentaux menés par la Demanderesse dans le cadre de la présente invention, des solutions de thrombine (référence T8885 Sigma) ont été

préparées : à une concentration de 100 UI/ml lorsqu'elle est utilisée à raison de 10 UI/test et sous forme de solution diluée (100 μ l de solution mère de thrombine additionnés de 900 μ l de tampon PBS), lorsqu'elle est
5 utilisée à raison de 1 UI/test.

L'agrégation des plaquettes par l'intermédiaire de la thrombine comporte les étapes suivantes :

- On place dans un tube 160 μ l de concentré plaquettaire auxquels on ajoute 20 μ l de tampon PBS et 20
10 μ l de thrombine
- On agite manuellement les tubes durant 5 minutes à température ambiante.
- On ajoute audits tubes 800 μ l de tampon PBS.
- On filtre le contenu des tubes sur un filtre
15 de porosité 11 μ m.
- On effectue des dilutions en série 1/20 à 1/10 à partir des filtrats.
- On filtre 100 μ l de chaque dilution du filtrat sur une membrane CB04.
- On effectue un marquage estérasique.
- On compte les plaquettes éventuellement
20 retenus sur la membrane.

Le tableau 1 ci-dessous illustre les résultats
25 obtenus et représente le nombre d'agrégats plaquettaires obtenu en présence de thrombine utilisée à deux concentrations différentes et la figure 1 en annexe illustre graphiquement ces résultats.

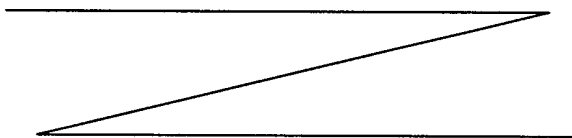


Tableau 1

	Contrôle	Thrombine 1 UI	Thrombine 10 UI
PC 6	1584	374	
	1535	490	
PC 6	2622	1358	44
	2737	1399	30

5 Exemple 2: Agrégation des plaquettes avec de la thrombine en présence de germes pathogènes.

Les travaux expérimentaux mis en œuvre afin d'évaluer l'agrégation des germes pathogènes en présence de thrombine comportent les étapes suivantes :

- 10 - Une cryosphère de *E. Coli* est introduite dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubé à 37°C durant 18-24 heures.
- On ajoute à 160 µl de concentré plaquettaire 20 µl de la suspension de *E.coli* et 20µl de thrombine.
- 15 - on agite manuellement le tube durant 5 minutes à température ambiante.
- On ajoute 800 µl de tampon PBS,
- On filtre à travers un filtre de porosité 11 µm,
- 20 - on effectue des dilutions en série : 1/20 et 1/10 et 1/10,
- On filtre 100 µl de l'échantillon, sur une membrane CB04
- On effectue un marquage estérasique
- 25 - On effectue la détection.

Le tableau 2 ci-dessous montre l'agrégation des concentrés plaquettaires avec de la thrombine en présence de *E.coli*.

Tableau 2

Germes pathogènes	Préparation Plaquettes	Thrombine	Résultats Dénombrement
<i>E. coli</i>	-	-	1921
	-	-	1999
<i>E. coli</i>	PC 6	-	657
			763
<i>E. coli</i>	PC 6	1 UI	140
			167
<i>E. coli</i>	PC 6	10 UI	109
			122

5

Après addition de la thrombine, un caillot apparaît presque instantanément.

Exemple 3: Agrégation des plaquettes en présence d'un agoniste faible: l'ADP.

10

De l'ADP (SIGMA) est utilisé à une concentration de 200 μM dans de l'eau distillée.

Les travaux expérimentaux mis en œuvre afin d'évaluer l'agrégation des plaquettes en présence d'ADP comportent les étapes suivantes :

15

- On introduit dans un tube 400 μl de concentré plaquettaire, auxquels on additionne 50 μl de tampon PBS et 50 μl d'ADP,

20

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante,

- On y ajoute 500 μl de tampons PBS,

- On effectue des dilutions en série de 1/20 et 1/10 et 1/10

- On filtre 100 μ l de l'échantillon sur une membrane CB04,
- On effectue un marquage estérasique, et
- On effectue la détection.

5

Les résultats illustrés sur la figure 1 montrent que, en présence d'ADP, la concentration de plaquettes est réduite d'environ 50% à environ 90%.

10 Exemple 4 : Agrégation plaquettaire avec de l'ADP en présence de germes pathogènes.

L'agrégation des plaquettes en présence d'ADP comporte les étapes suivantes :

- Une cryobille de *Staph epidermidis* est introduite dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubée à 37°C durant 18-24 heures.

- Sur 400 μ l de concentré plaquettaire on ajoute 50 μ l de la suspension de *Staph epidermidis* et 50 μ l d'ADP,

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante

- On y ajoute 500 μ l de tampon PBS,
- On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 μ m,

- On effectue des dilutions en série de 1/20 et 1/10 et 1/10,

- On filtre 100 μ l de l'échantillon sur une membrane CB04

- On effectue un marquage estérasique,
- On effectue la détection.

30

Les germes pathogènes sontensemencés à une concentration élevée de manière à augmenter un possible

effet de piégeage. L'ADP est ajouté aux plaquettes et aux bactéries à une concentration de 10 μM .

Tableau 3

Germe pathogène	Préparation plaquettaire	Agrégant	Résultats	Concentration bactéries/ml
<i>Staph.epidermidis</i>	PC 6	néant	590 605	6,0E+07
<i>Staph.epidermidis</i>	PC 6	ADP 10 μM	492 441	4,7E+07

5

Les résultats obtenus, représentés sur le Tableau 3 ci-dessus montrent que 74 % de bactéries sont récupérées après l'étape d'agrégation

10

Exemple 5 : Agrégation des plaquettes en présence d'un anticorps CD9.

Il est connu que l'anticorps CD9 induit l'activation des plaquettes et par conséquent leur agrégation.

15

La concentration initiale de l'anticorps CD9 issu du clone SN4 156-020 d'Ancel, est de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Le procédé d'agrégation sélective mis en œuvre avec cet anticorps CD9 comporte les étapes suivantes :

20

- Sur 400 μl de concentré plaquettaire on ajoute 50 μl de tampon PBS et 50 μl d'anticorps CD9,

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante

25

- On y ajoute 500 μl de tampon PBS,

- On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 μm

- On effectue des dilutions en série de 1/20 et 1/10 et 1/10,

- On filtre 100 μ l de l'échantillon sur une membrane CB04,

5 - On effectue un marquage estérasique,

- On effectue la détection.

L'anticorps CD9 a été utilisé en présence des plaquettes à une concentration finale de 10 μ g/ml.

10

La figure 2 en annexe illustre l'agrégation des plaquettes obtenue en présence d'anticorps CD9.

Afin d'évaluer la concentration optimale de l'anticorps CD9 nécessaire pour l'agrégation plaquettaire, une courbe dose-réponse a été établie.

15

Méthode :

- Sur 400 μ l de concentré plaquettaire placés dans des tubes on ajoute différentes dilutions d'anticorps, avec des concentrations finales allant de 0 à 20 μ g/ml en anticorps CD9.

20

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante

- On y ajoute 500 μ l de tampon PBS,

- On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 μ m

25

- On effectue des dilutions en série : 4 dilutions 1/10

- On filtre 100 μ l de l'échantillon sur une membrane CB04

30

- On effectue un marquage estérasique,

- On effectue la détection

Les figures 3 et 4 montrent respectivement les résultats du dénombrement des plaquettes agrégées en présence de doses croissantes d'anticorps CD9 et la courbe dose-réponse ainsi obtenue.

5 Le dénombrement des plaquettes résiduelles est effectué avec l'Analyseur.

L'agrégation est dose-dépendante. Pour augmenter l'effet d'agrégation, la concentration en CD9 a été augmentée autant que possible. Cependant un compromis a
10 été établi pour la détection des bactéries, et l'on a déterminé que la concentration plaquettaire peut être réduite de 1 à 2 Log en utilisant une concentration d'environ 10 µg/ml d'anticorps CD9.

15 Exemple 6 : Agrégation plaquettaire avec l'anticorps CD9 en présence de bactéries.

Méthode :

- Une cryobille de Staph epidermidis est introduite dans un tube de bouillon tryptone soja et
20 incubée à 37°C durant 18-24 heures.

- Sur 400 µl de concentré plaquettaire placés dans des tubes on ajoute 50 µl de la suspension de Staph epidermidis et 50 µl de CD9,

- Les tubes sont agités manuellement durant 5
25 minutes à température ambiante

- On y ajoute 500 µl de tampon PBS,

- On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 µm

- On effectue des dilutions en série : 4
30 dilutions 1/10

- On filtre 100 µl de l'échantillon sur une membrane CB04

- On effectue un marquage estérasique.

- On effectue la détection

Le tableau 4 ci-dessous illustre l'agrégation des plaquettes avec du CD9 en présence de bactéries.

5

Tableau 4

Bactéries	CD9	Résultat	% de récupération
Staph.epidermidis	PC -	46	93
	10 -	44	
Staph.epidermidis	PC + Agitation	43	
	10 + Agitation	48	
<i>E. coli</i>	PC	218	64
	10	243	
<i>E. coli</i>	PC CD 9 +	166	
	10 Agitation	148	

Ces résultats montrent que les bactéries Staph epidermidis ont été bien récupérées. Pour E.Coli le dénombrement est réduit de 36%.

10

I.2. Agglutination de globules rouges.

Les lectines sont des glycoprotéines d'origine non-immune qui agglutinent les cellules et/ou précipitent des complexex carbohydrates. Ces molécules se lient couramment à des carbohydrates spécifiques.

15

Dans le cadre de ces travaux expérimentaux, deux lectines ont été utilisées :

- Phaseolus vulgaris PHA-E
- Vicia Sativa

20

Exemple 1 : Agglutination de globules rouges avec des lectines.

La lectine Phaseolus vulgaris PHA-E (Sigma) a été utilisée à une concentration de 2 mg/ml dans du PBS.

La lectine Vicia Activa (Sigma) a été utilisée à la concentration de 1 mg/ml.

5 Une évaluation rapide des deux lectines a permis de vérifier qu'il n'y a pas d'agglutination des globules rouges avec Vicia sativa. D'autre part Phaseolus vulgaris induit une agglutination rapide et efficace.

10 Méthode :

- 400 μ l de globules rouges sont placés dans des tubes auxquels on ajoute 50 μ l de PBS et 50 μ l de Phaseolus vulgaris,

15 - Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante

- On y ajoute 500 μ l de tampon PBS,

- On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 μ m,

20 - On effectue des dilutions en série : 4 dilutions 1/10

- On effectue un marquage avec un anticorps anti-glycophorine-PE.

- On effectue la détection

25 La figure 5 en annexe montre l'agglutination des globules rouges obtenue en présence de Phaseolus vulgaris.

Dans ce test, Phaseolus vulgaris a été utilisée à une concentration de 200 μ g/ml.

30 On observe une diminution reproductible de deux logs de la concentration en globules rouges en présence de Phaseolus vulgaris.

Exemple 2 : Agglutination de globules rouges en présence de bactéries.

Les tests préliminaires ont montré qu'il n'y a pas d'interaction entre la lectine Phaseolus et les bactéries.

Méthode

Une cryobille de E.coli est introduite dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubée à 37°C durant 18-24 heures.

- On mélange dans des tubes, 400 μ l de PBS, 50 μ l de E.coli (culture pure) et 50 μ l de Phaseolus vulgaris,
- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante
- On y ajoute 500 μ l de tampon PBS,
- On effectue une filtration sur un filtre de 5 μ m,
- On effectue des dilutions en série : 4 dilutions 1/10,
- On filtre 100 μ l de l'échantillon sur une membrane CB04,
- On effectue un marquage estérasique,
- On effectue la détection.

Les résultats obtenus, en utilisant une concentration Phaseolus vulgaris de 200 μ g/ml sont illustrés dans le Tableau 5 ci-dessous

Tableau 5

Bactéries	Globules rouges	Lectine (Concentration)	Dénombrement	% récupération
<i>E. coli</i>	RBC 9		662	
NCTC 9001			604	
<i>E. coli</i>	RBC 9	Phaseolus	544	
NCTC 9001		200 μ g/ml	579	91

5 Ces résultats montrent que 91% des bactéries sont détectées après l'étape d'agglutination et qu'après cette étape d'agglutination, la concentration en globules rouges est réduite de deux logs alors que la souche *E. coli* est encore bien récupérée.

10 II. CONCENTRATION DE GERMES PATHOGENES AU MOYEN D'UNE ETAPE DE LYSE.

Dans le cadre de la présente invention, la demanderesse a effectué une mise au point des différentes techniques de lyse sélective permettant l'élimination des cellules sanguines sans affecter la concentration des bactéries éventuellement présentes dans les échantillons à analyser.

20 Suite à quelques études préalables, la Demanderesse a constaté que certaines bactéries sont résistantes en présence de détergents tels que le Triton X100 et a déterminé la concentration optimale de détergent avec laquelle le pourcentage de récupération de bactéries est optimale.

Exemple 1 : Effet de la formulation de la solution de lyse sur des cultures de bactéries pures.

Méthode

5 - Les souches sont conservées dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubées à 37 °C durant 18-24 heures.

- Des dilutions en série (1/10) ont été effectuées dans du tampon PBS jusqu'à 10^{-5}

10 - Un millilitre de la dernière dilution est traité avec 9 ml de la solution de lyse (0,01 % de saponine, 0,1% de Tween et 0,001% triton X 100) durant 15 minutes

- 100 μ l de l'échantillon sont filtrés sur une membrane CB04

15 - Un marquage estérasique est effectué selon les indications figurant en annexe 1

- On effectue la détection.

20 Les résultats de ces différents essais sont illustrés dans le tableau 6 ci-dessous, dans lequel sont exprimées les différents % de récupération des bactéries obtenus.

Tableau 6

Souche	Contrôle	Échantillon lysée	% de récupération
<i>E. coli</i>	132	153	98
	145	119	
<i>Bacillus cereus</i>	465	61	11
	572	54	
<i>E. coli</i>	52	44	83
	54	44	
<i>Staph. epidermidis</i>	2952	3034	101
	3069	3020	

Souche	Contrôle	Échantillon lysée	% de récupération
<i>E. aerogenes</i>	841	880	110
	802	925	
<i>Ps. aeruginosa</i>	261	82	31
	215	66	
<i>Staph. aureus</i>	105	126	125
	94	122	
<i>P. mirabilis</i>	729	1129	139
	906	1151	
<i>S. typhymurium</i>	608	820	133
	600	787	
<i>Serratia marcescens</i>	1848	1826	102
	1775	1860	
<i>C. amycolatum</i>	1103	1512	156
	1167	2035	
<i>K. pneumoniae</i>	72	79	99
	82	73	
<i>P. fluorescens</i>	4039	4873	125
	3951	5105	
<i>Streptococcus bovis</i>	3074	1848	64
	2939	1978	
<i>Y. enterocolitica</i>	10218	9888	99
	10321	10526	

Ces résultats sont illustrés sur la figure 6 en annexe.

La plupart des souches ne sont pas affectées par la solution de lyse: les pourcentages de récupération sont cohérents avec les prévisions prédéfinies, entre 95 et 115%, sauf pour *Ps. aeruginosa* et *Bacillus cereus*.

Exemple 2 : Effet de la formulation de la solution de lyse sur les bactéries ensemencées dans des plaquettes.

De manière à simuler une contamination, deux souches ont été adaptées à la croissance dans des concentrés plaquettaires.

5 Méthode

- Les souches *Bacillus cereus* et *Staph. aureus* ont étéensemencées dans des plaquettes dans des tubes de 50 ml en utilisant une concentration de 10^5 cellules dans 20 ml de plaquettes.

10 - Ces tubes de 50 ml sont conservés dans l'incubateur de plaquettes à 22 °C durant plusieurs jours,

- Un millilitre de plaquettes ensemencées est dilué avec 9 ml de la solution de lyse,

15 - La lyse est effectuée durant 15 minutes à température ambiante,

- 100 μ l de l'échantillon sont filtrés sur une membrane CB047,

- Les bactéries sont marquées avec un substrat stéarique comme indiquée en annexe 1,

20 - La membrane est balayée avec l'Analyseur.

Les résultats du dénombrement des bactéries après la lyse sont illustrés dans le tableau 7 ci-dessous.

25 Tableau 7

	Contrôle Lysés	
Bacillus cereus	16	14
	24	27
	bactéries/ml $2,0E+06$	$2,1E+06$
Staph. aureus	1966	1885
	2046	1901
	bactéries/ml $2,0E+08$	$1,9E+08$

Les bactéries ont été ensemencées à une concentration initiale de $5 \cdot 10^3$ cellules/ml et sont détectées plusieurs jours plus tard à des concentrations de l'ordre de 10^6 à 10^9 cellules /ml.

5

Il en résulte des ces expériences, que les bactéries qui se sont développées dans les plaquettes n'ont pas été affectées par la solution de lyse.

10 Exemple 3 : Effet de la formulation de la composition de lyse sur les globules rouges.

Méthode

- Un millilitre de globules rouges est dilué dans 9 ml de solution de lyse ou 9 ml de PBS (contrôle).

15 - la lyse est effectuée durant 15 minutes à température ambiante

- les échantillons lysés ou non sont analysés à l'aide d'un compteur cellulaire.

20 La figure 8 montre les résultats obtenus sur la préparation de globules rouges lysée par rapport à une préparation de globules rouges non lysée.

25 Exemple 4 : Effet de la formulation de la composition de lyse sur les plaquettes.

La reproductibilité de l'efficacité de la solution de lyse a été testée. Des échantillons différents de plaquettes ont été lysés et analysés.

Méthode:

30 - Un millilitre de plaquettes est dilué dans 9 ml de solution de lyse

- la lyse est effectuée durant 15 minutes à température ambiante

- Des dilutions en série (1/10) ont été effectuées dans du tampon PBS jusqu'à 10^{-5}

- 100 μ l de l'échantillon sont filtrés sur une membrane CB04.

5 - les microorganismes sont marqués avec un substrat estérasique

- la membrane est balayée avec l'analyseur.

La figure 7 en annexe illustre les résultats de la lyse obtenue avec différents échantillons de plaquettes.

10

III. CONCENTRATION DE GERMES PATHOGENES AU MOYEN DE DEUX ETAPES D'AGREGATION ET DE LYSE.

La préparation de l'échantillon par concentration des germes pathogènes en deux étapes comprend :

15

1) L'Agrégation ou agglutination spécifique des cellules du produit sanguin.

2) La Lyse spécifique des cellules du produit sanguin.

20

Exemple 1: Séparation spécifique des plaquettes

Méthode :

- Une cryobille de E.coli est introduite dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubée à 37°C durant 18-24 heures.

25

La première étape d'agrégation est effectuée comme suit :

- On mélange dans des tubes, 1 ml de concentré plaquettaire, 50 μ l de E.coli (culture pure) et 100 μ l de CD 9,

30

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante.

La deuxième étape de lyse est alors effectuée :

- On ajoute 900 μ l de tampon de lyse à 100 μ l du filtrat après agrégation,

- On maintient l'ensemble 15 minutes à température ambiante,

5 - On effectue des dilutions en série : 4 dilutions 1/10

- On filtre 100 μ l de l'échantillon ainsi obtenu sur une membrane CB04,

10 - On effectue un marquage des bactéries et des plaquettes avec un substrat estérasique (Annexe 1)

- On dénombre les bactéries et les plaquettes avec l'Analyseur.

15 Les résultats obtenus en effectuant le procédé de concentration des bactéries en deux étapes sont illustrés dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8

bactéries	Concentré plaquettaire (PC)	Agent agrégant		Dénombrement bactéries	% récupération bactéries
<i>E. coli</i> NCTC 9001	PC			337 313	
<i>E. coli</i> NCTC 9001	PC		Lyse	302 256	86%
<i>E. coli</i> NCTC 9001	PC	CD9		266 161	66%
<i>E. coli</i> NCTC 9001	PC	CD9	Lyse	157 138	45%

Exemple 2. Séparation spécifique des globules rouges.

Méthode :

5 - Une cryobille de E.coli est introduite dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubée à 37°C durant 18-24 heures.

L'étape d'agglutination est effectuée comme suit :

10 - On mélange dans des tubes, 1 ml de globules rouges, 50 μ l de E.coli (culture pure) et 125 μ l de lectine,

- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante

15 - On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 μ m.

La deuxième étape de lyse est alors effectuée :

- On ajoute 900 μ l de tampon de lyse à 100 μ l du filtrat après agglutination,

20 - On maintient l'ensemble 15 minutes à température ambiante,

- On effectue des dilutions en série : 4 dilutions 1/10

- On filtre 100 μ l de l'échantillon ainsi obtenu sur une membrane CB04,

25 - On effectue un marquage des bactéries avec un substrat estérasique et des globules rouges avec un anticorps anti-Glycophorine-PE (appendix 2)

- On dénombre les bactéries et les globules rouges avec l'Analyseur.

30

Le tableau 9 ci-dessous montre les résultats obtenus avec le dénombrement des bactéries effectué après

l'étape d'agglutination des globules rouges avec la lectine suivie de l'étape de lyse.

Tableau 9

				Dénombrement des bactéries	récupération des bactéries (%)	Dénombrement des globules rouges
<i>E. coli</i> NCTC 9001	Globules rouges 10			441		3582
				449		4188
<i>E. coli</i> NCTC 9001	Globules rouges 10	Lectine	Lyse	261	68	161
				348		180

5

Après agglutination la concentration en globules rouges a été réduite de 1,5 log.

Soixante huit (68) % des bactéries sont récupérées après ces deux étapes.

10

IV. AGENTS DE MARQUAGE

Exemple 1. Substrat estérasique ChemChrome V6

Des solutions de marquage peuvent être préparées à partir d'un substrat estérasique et utilisées dans le procédé de détection de l'invention selon le protocole suivant

15

a) Préparation

20

- 10 μ l du substrat estérasique ChemChrome V6 par millilitre de tampon ChemSol B16 (500 μ l de solution de marquage par membrane)

- cette solution est conservée à 4°C à l'abri de la lumière au maximum 4 heures.

b) Utilisation

Introduire un tampon de marquage dans une boîte de Pétri de 33 mm de diamètre.

5 Distribuer 500 μ l de la solution de marquage sur le tampon.

Placer la membrane CB04 sur la rampe de filtration. Filtrer 100 μ l de l'échantillon à analyser.

Placer la membrane sur le tampon.

10 Incuber durant 15 minutes à 37°C.

Exemple 2. Anticorps marqué.

Aussi, une solution de marquage comprenant un anticorps marqué peut être utilisée dans le procédé de détection de l'invention selon le protocole suivant

15 - Prélever 90 μ l d'une dilution de l'échantillon,

- Ajouter 10 μ l de l'anticorps anti-glycophorine-PE,

20 - Vortexer et incuber durant 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière,

- Ajouter 900 μ l de tampon PBS,

- Placer la membrane CB04 dans la rampe de filtration,

25 - Filtrer sous vide 100 μ l de la solution à analyser,

- Analyser la membrane dans l'Analyseur en inversant les câbles primaire et tertiaire de l'Analyseur.

V. CONCLUSIONS

30 Les options techniques pour atteindre les meilleurs conditions de préparation des germes pathogènes ont été définies à l'aide de ses travaux expérimentaux.

En ce qui concerne les concentrés plaquettaires ces options techniques comportent :

- 1) Etape d'agrégation avec par exemple un anticorps activateur plaquettaire tel que CD9,
- 5 2) Etape de lyse cellulaire avec une combinaison des détergents tels que saponine, Tween 20 et Triton X 100.

En ce qui concerne les concentrés de globules rouges :

- 1) Etape d'agglutination avec une lectine telle que par exemple Phaseolus vulgaris,
- 10 2) Etape de lyse cellulaire avec une combinaison de détergents tels que saponine, Tween 20 et Triton X 100.

Le marquage des germes pathogènes pouvant intervenir indistinctement lors de l'étape d'agrégation, lors de l'étape de lyses ou directement sur les germes concentrés sur le dernier filtre avant analyse.

REVENDICATIONS

1) Procédé de concentration de germes
contaminants éventuellement présents dans un produit
5 sanguin comprenant des cellules sanguines, caractérisé en
ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) on soumet un échantillon dudit produit
sanguin à un traitement d'agrégation des cellules
sanguines,

10 b) on élimine les agrégats formés à l'étape (a)
par passage de l'échantillon traité sur un premier filtre
laissant passer les germes contaminants mais pas les
agrégats de cellules,

c) on lyse sélectivement les cellules
15 résiduelles du filtrat obtenu à l'étape (b),

d) on récupère les germes contaminants par
passage du lysat de l'étape (c) sur un second filtre
laissant passer les débris cellulaires.

20 2) Procédé de détection de germes contaminants
dans un produit sanguin comprenant des cellules sanguines,
caractérisé en ce que l'on concentre lesdits germes sur un
filtre selon les étapes (a) à (d) du procédé selon la
revendication 1, puis en ce que :

25 (e) on analyse le second filtre pour détecter
les germes contaminants éventuellement retenus.

3) Procédé de détection selon la revendication
2, caractérisé en ce que l'on ajoute un agent de marquage
30 des germes contaminants, soit lors de l'agrégation de
l'étape (a), soit lors de la lyse de l'étape (c), soit
directement sur le deuxième filtre lors de l'étape (e)
d'analyse.

4) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les cellules sanguines du produit sanguin sont des plaquettes ou des globules rouges ou un mélange de ceux-ci.

5

5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le produit sanguin comprend des plaquettes et en ce que le traitement d'agrégation de l'étape (a) comprend la mise en contact de l'échantillon avec une composition d'agrégation comprenant au moins l'un des agents d'agrégation choisis dans le groupe comprenant :

10

- un anticorps spécifique d'un antigène plaquettaire,

15

- un agoniste fort de l'activation plaquettaire choisi parmi : la thrombine, le TRAP (thrombin receptor activating peptide), la trypsine, le collagène, le thromboxane A₂, le PAF (platelet activating factor), le ionophore A23187, les complexes immuns et facteurs du complément,

20

- un agoniste faible de l'activation plaquettaire choisi parmi ADP, adrénaline, acide arachidonique, facteur Von Willebrand, sérotonine ou épinéphrine.

25

6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la concentration en anticorps de type CD9 dans la composition d'agrégation est comprise entre 0,5 µg/ml et 50 µg/ml, et de préférence entre 1 µg/ml et 10 µg/ml.

30

7) Procédé selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que la concentration en agoniste fort dans la composition d'agrégation est comprise entre :

- 0,5 UI/ml et 100 UI/ml et de préférence entre 1 UI/ml et 20 UI/ml pour un agoniste de type thrombine,
- 5 μ M et 200 μ M et de préférence entre 10 et 100 μ M pour un agoniste de type TRAP,
- 5 - 1 nM et 500 nM et de préférence entre 10 nM et 300 nM pour un agoniste de type trypsine,
- 0,05 μ g/ml et 50 μ g/ml et de préférence entre 1 μ g/ml et 20 μ g/ml pour un agoniste de type collagène,
- 0,01 μ g/ml et 5 μ g/ml et de préférence entre 10 0,1 et 1 μ g/ml pour un agoniste du type thromboxane A₂,
- 0,005 mg/ml et 1 mg/ml et de préférence entre 0,05 et 0,5 mg/ml pour un agoniste du type PAF,
- 0,1 μ M et 100 μ M et de préférence entre 1 μ M et 20 μ M pour un agoniste du type ionophore A23187.

15

8) Procédé selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que la concentration en agoniste faible dans la composition d'agrégation est comprise entre :

- 20 - 0,5 μ M et 100 μ M et de préférence entre 1 μ M et 20 μ M pour un agoniste du type ADP, du type adrénaline ou du type épinéphrine.
- 0,001 mM et 10 mM et de préférence entre 0,01 et 5 pour un agoniste du type acide arachidonique,
- 25 - 0,001 mg/ml et 1 mg/ml et de préférence entre 0,01 mg/ml et 0,5 mg/ml pour un agoniste du type facteur Von Willebrand, ou
- 0,05 μ M et 100 μ M et de préférence entre 0,01 μ M et 50 μ M pour un agoniste du type sérotonine.

30

9) Procédé selon l'une des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que l'anticorps est choisi parmi : un

anticorps anti-CD9, CD32, anti-PTA1, CD42, anti-GpIIb/IIIa, anti-GpIV.

5 10) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le produit sanguin comprend des globules rouges et en ce que le traitement d'agrégation de l'étape (a) comprend la mise en contact de l'échantillon avec une composition d'agglutination comprenant au moins un agent
10 d'agglutination choisi parmi les lectines.

 11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les lectines présentent une activité érythroagglutinine.
15

 12) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les lectines sont choisies parmi les lectines de *Phaseolus vulgaris*, *Vicia sativa*, *Vicia faba* ou *Erythrina corallodendron*.
20

 13) Procédé selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que la concentration de lectine de type *Phaseolus vulgaris* dans la composition d'agglutination est comprise entre 10 µg/ml et 200 µg/ml.
25

 14) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la lyse des cellules de l'étape (c) est réalisée avec une solution de lyse comprenant un ou plusieurs détergents choisis dans le groupe comprenant : saponine, SDS, Tween 20, Triton
30 X100, Brij 96, Polidocanol, ou Carbonate de sodium.

15) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la solution de lyse est constitué d'un mélange de saponine, de TRITON X100 et de TWEEN 20.

5 16) Procédé selon l'une des revendications 14 ou 15, caractérisé en ce que la solution de lyse comprend de la saponine à une concentration comprise entre 0,005 % et 0,5 %, du TRITON X100 à une concentration comprise entre 0,001 % et 0,5 % du TWEEN 20 à une concentration comprise
10 entre 0,01 % et 1%.

17) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les germes contaminants sont des bactéries aérobies ou
15 anaérobies, des moisissures, des levures, des spores de bactéries vivantes et/ou mortes.

18) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la taille
20 des pores du premier filtre est comprise entre 2 μm et 20 μm .

19) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la taille
25 des pores du second filtre est comprise entre 0,2 μm et 2 μm .

20) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les
30 germes contaminants sont des bactéries aérobies ou anaérobies, des moisissures, des levures ou des spores de bactéries vivantes et/ou mortes , en ce que la taille des pores du premier filtre est comprise entre 2 μm et 20 μm ,

et en ce que la taille des pores du second filtre est comprise entre 0,2 μm et 2 μm .

5 21) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 19, caractérisé en ce que la détection des germes contaminants de l'étape (e) est réalisée dans un dispositif clos.

10 22) Dispositif pour la concentration de germes contaminants éventuellement présents dans un produit sanguin comprenant des cellules sanguines, susceptible d'être mis en œuvre dans un procédé selon la revendication 2 à 21, caractérisé en ce qu'il comprend :

15 - un premier réservoir (1) étanche et stérile contenant au moins un agent d'agrégation de cellules sanguines et éventuellement au moins un agent de marquage de germes pathogènes,

20 - un deuxième réservoir (2) étanche et stérile contenant au moins un agent de lyse de cellules sanguines et éventuellement au moins un agent de marquage de germes pathogènes,

25 - un premier filtre (3) placé entre le premier et le deuxième réservoir capable de retenir les agrégats formés dans ledit premier réservoir,

30 - un deuxième filtre (4) placé en aval du deuxième réservoir capable de retenir les éventuels germes contaminants,

 - des moyens de connexion (5) étanches et stériles placés, entre le premier réservoir et le premier filtre, entre le premier filtre et le deuxième réservoir et entre le deuxième réservoir et le deuxième filtre.

23) Dispositif selon la revendication 22 caractérisé en ce qu'il comprend une connexion (6) étanche et stérile pour relier la poche contenant le produit sanguin au premier réservoir stérile.

5

24) Dispositif selon la revendication 23, caractérisé en ce que ladite connexion étanche et stérile reliant la poche contenant le produit sanguin au premier réservoir stérile est munie d'une valve (7) anti-retour.

10

25) Dispositif selon les revendications 23 ou 24, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens d'échantillonnage d'un volume déterminé du produit sanguin directement à partir d'une poche de stockage dudit produit vers ledit premier réservoir.

15

26) Dispositif selon les revendications 22 à 25, caractérisé en ce que le premier réservoir stérile est muni d'un système d'aspiration de l'échantillon (8).

20

27) Dispositif selon la revendication 26, caractérisé en ce que le système d'aspiration est un piston.

25

28) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 22 à 27, caractérisé en ce que le deuxième filtre est inclus dans un support de membrane composé de 2 parties pouvant être dissociées permettant de récupérer le filtre.

30

29) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 22 à 28, caractérisé en ce qu'il est clos et stérile.

FIGURE 1

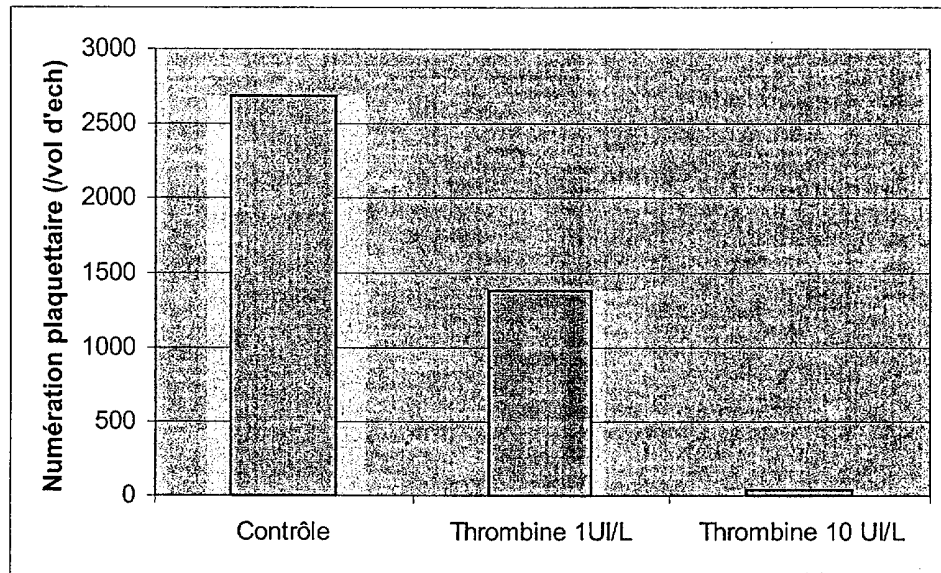


FIGURE 2

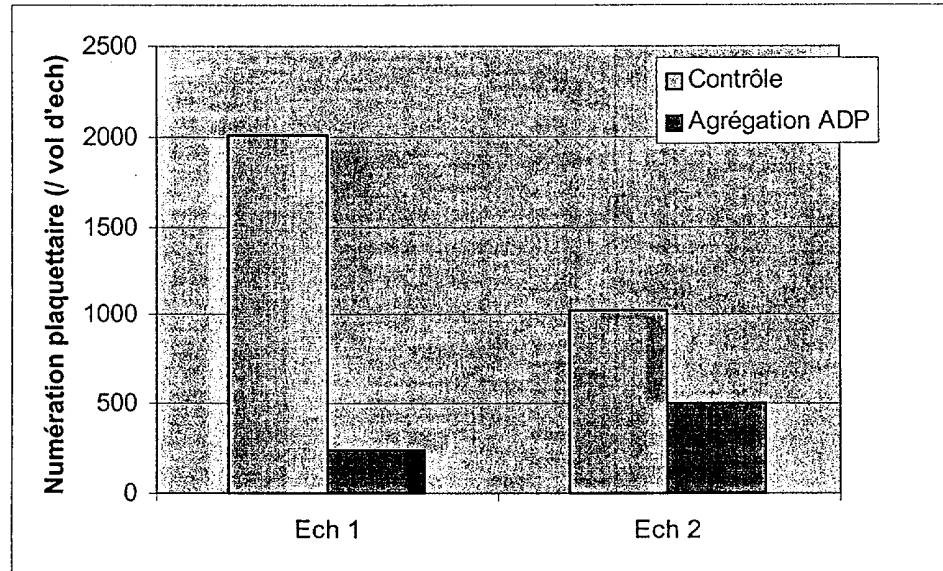


FIGURE 3

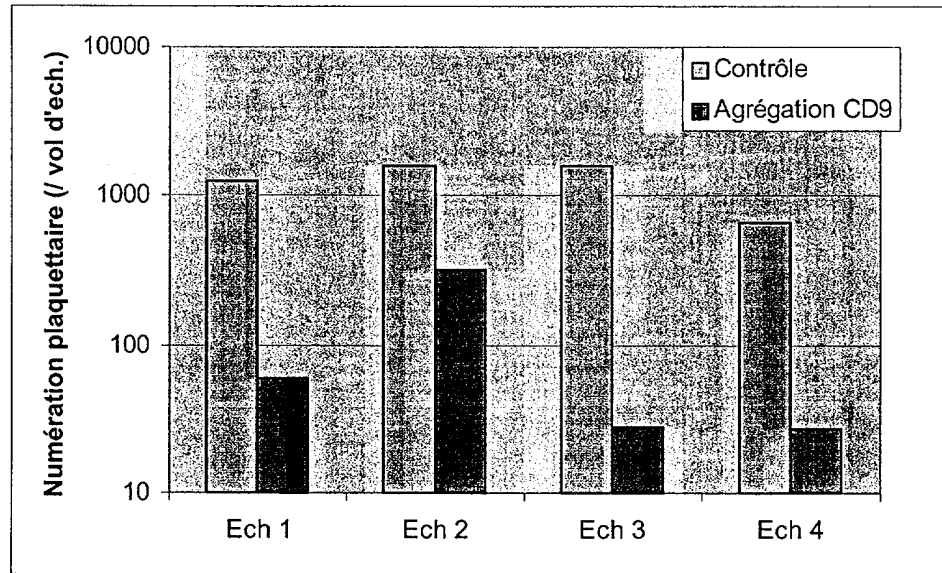


FIGURE 4

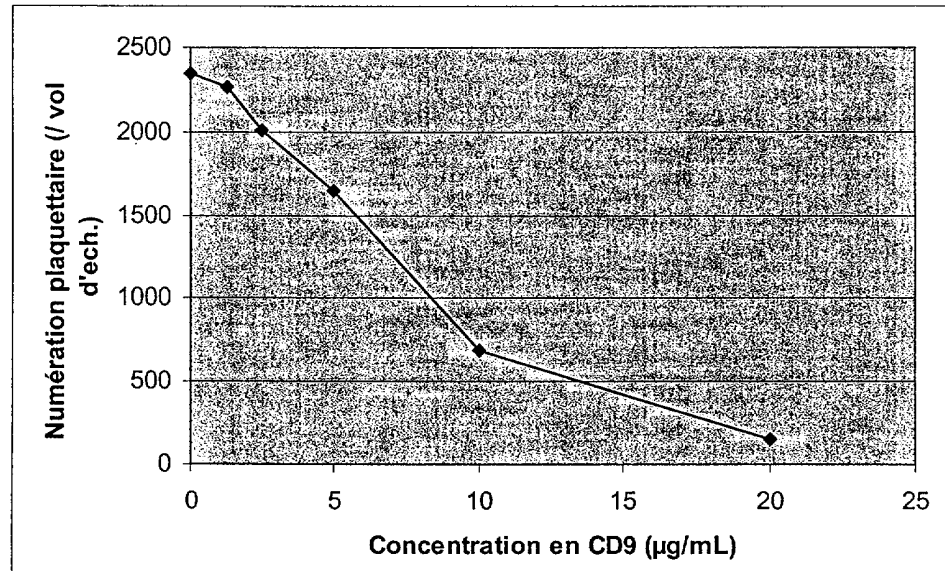


FIGURE 5

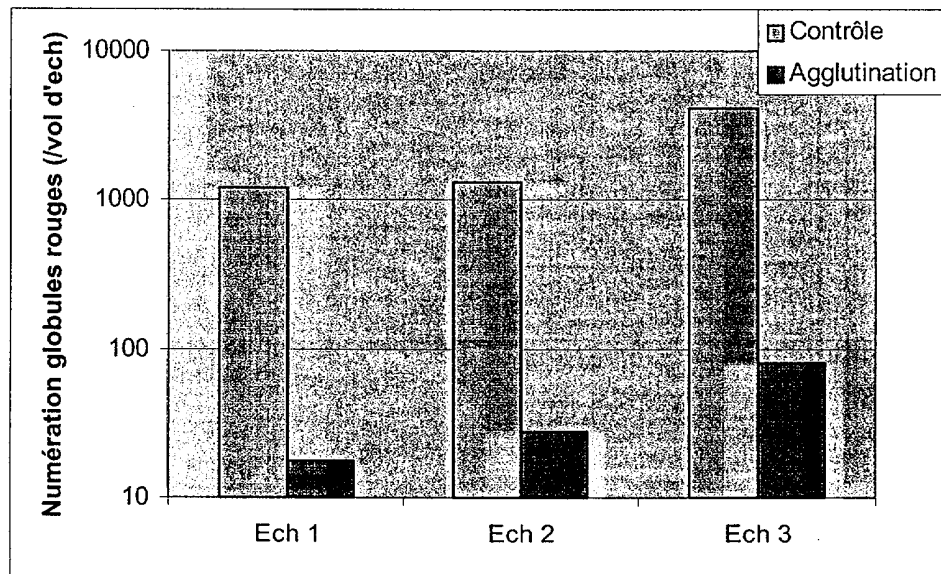


FIGURE 6

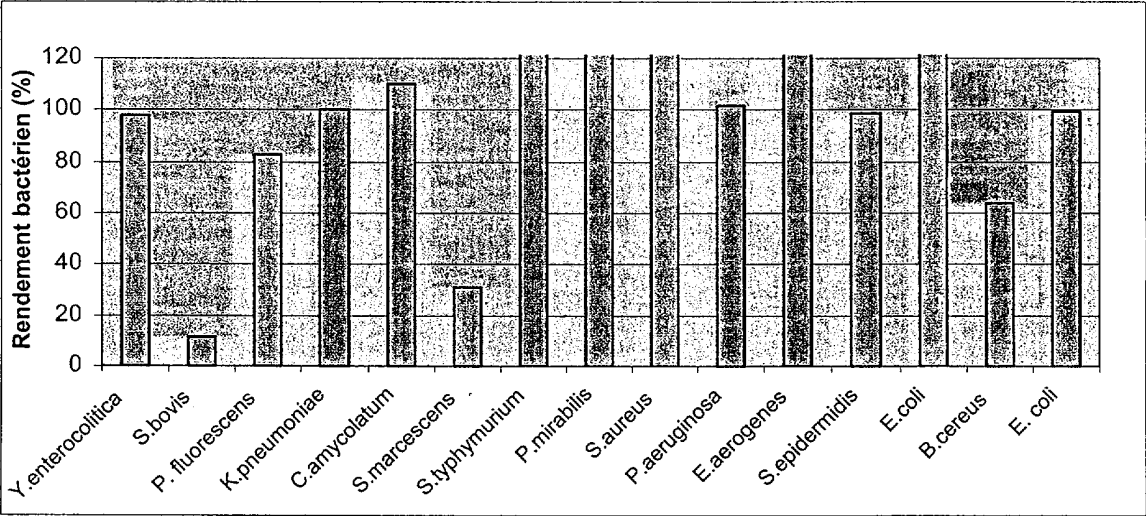


FIGURE 7

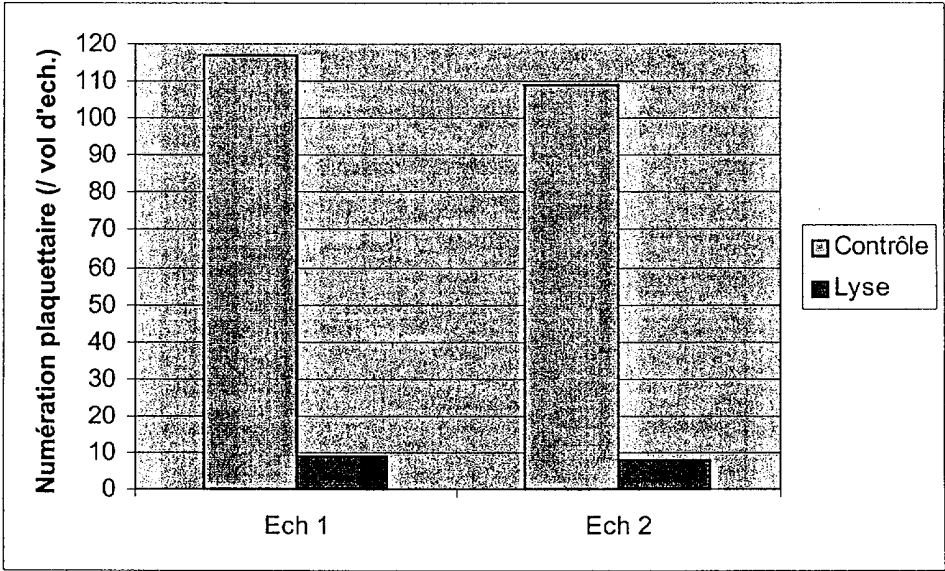


FIGURE 8

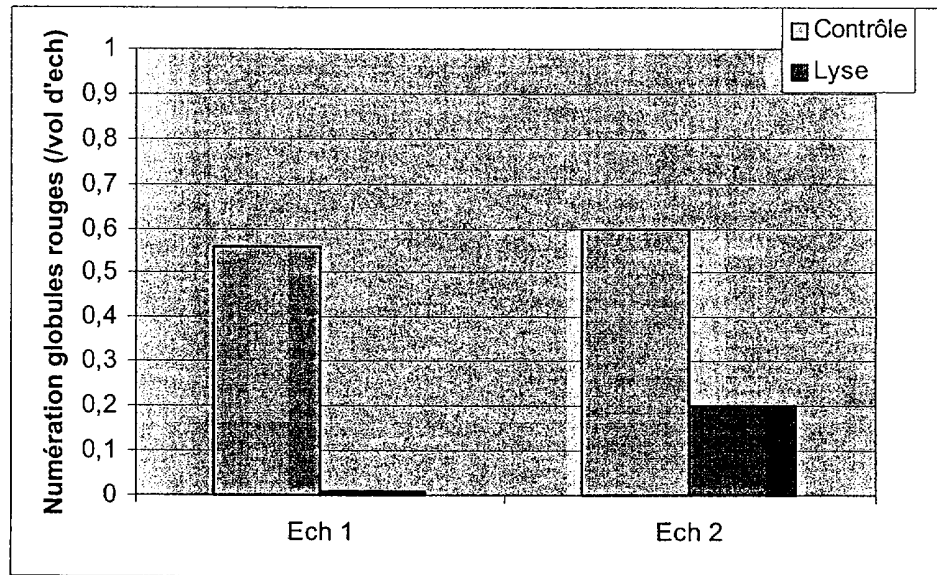
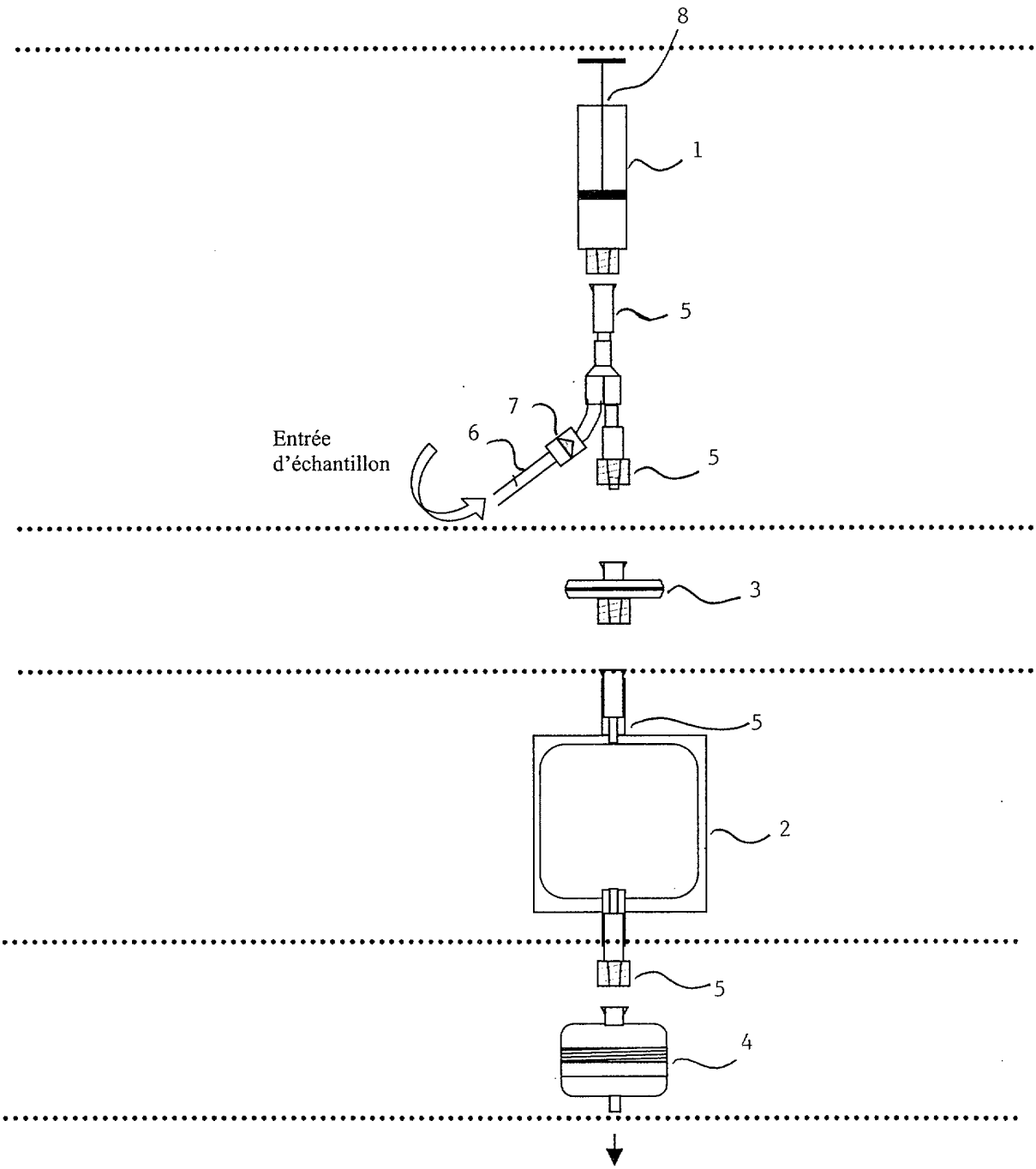


FIGURE 9



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

2829500

N° d'enregistrement
national

FA 611000
FR 0111873

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	DE 198 01 090 A (BALES UWE ;HAASE GERHARD (DE); SCHNITZLER NORBERT (DE)) 15 juillet 1999 (1999-07-15) * revendications *	1-29	C12Q1/22 C12Q1/24 C12Q1/04 C12M1/12
Y	US 3 635 798 A (KIRKHAM WILLIAM R ET AL) 18 janvier 1972 (1972-01-18) * page 2, ligne 8-24 * * colonne 3, ligne 19-23 * * colonne 3, ligne 48 - colonne 4 * * colonne 6, ligne 39-56 *	1-29	
A	US 5 981 294 A (ALLEN MICHAEL P ET AL) 9 novembre 1999 (1999-11-09) * colonne 3, ligne 30-43 * * colonne 5, ligne 14-17 *	1-29	
A	US 5 316 731 A (SCHRENK W JUERGEN ET AL) 31 mai 1994 (1994-05-31) * colonne 5, ligne 10-50 *	1-29	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			C12Q C12M
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 août 2002		Vadot-Van Geldre, E	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0111873 FA 611000

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
 Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date d'09-08-2002
 Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 19801090 A	15-07-1999	DE 19801090 A1	15-07-1999
US 3635798 A	18-01-1972	AUCUN	
US 5981294 A	09-11-1999	AU 1126197 A	19-06-1997
		CA 2238926 A1	05-06-1997
		EP 0891544 A1	20-01-1999
		JP 2000501183 T	02-02-2000
		WO 9720207 A1	05-06-1997
US 5316731 A	31-05-1994	AT 149880 T	15-03-1997
		AU 667760 B2	04-04-1996
		AU 5457794 A	08-06-1994
		CA 2146257 A1	26-05-1994
		DE 69308875 D1	17-04-1997
		DE 69308875 T2	03-07-1997
		DK 669855 T3	15-09-1997
		EP 0669855 A1	06-09-1995
		ES 2099984 T3	01-06-1997
		GR 3023338 T3	29-08-1997
		JP 3286919 B2	27-05-2002
		JP 8511957 T	17-12-1996
		WO 9411107 A1	26-05-1994