

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 908 890**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **06 00148**

⑤① Int Cl⁸ : **G 01 N 33/569** (2006.01), G 01 N 33/68, C 12 Q 1/68,
C 12 R 1/445, 1/45, A 61 K 48/00, 39/085, A 61 P 31/04

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 09.01.06.

③⑦ Priorité : 08.12.05 FR 0512459.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 23.05.08 Bulletin 08/21.

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) : *ABAG Société anonyme* — FR.

⑦② Inventeur(s) : *ARIE JEAN PHILIPPE.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : *CABINET SAUVAGE.*

⑤④ **UTILISATION DE LA PROTEINE 5G1 DANS LE DIAGNOSTIC IN VITRO D'INFECTIONS A STAPHYLOCCUS
AUREUS ET/OU EPIDERMIDIS.**

⑤⑦ L'invention a pour objet l'utilisation de nouveaux poly-
peptides, ou de fragments ou variants desdits polypeptides,
l'utilisation des séquences codant pour lesdits polypeptides
et l'utilisation d'anticorps dirigés contre lesdits polypeptides
dans le domaine du diagnostic in vitro d'infections à Staphy-
lococcus aureus et/ou epidermidis sur matériel étranger im-
planté dans le corps.

FR 2 908 890 - A1



Utilisation de la protéine 5G1 dans le diagnostic *in vitro* d'infections à *Staphylococcus aureus* et/ou *epidermidis*.

La présente invention concerne un outil de diagnostic
5 sérologique des infections staphylococciques sur prothèses articulaires (par exemple : infection sur prothèse de hanche, coude, genou, cheville,...) et, plus généralement, des infections staphylococciques sur matériel étranger implanté dans le corps.

10 L'invention comprend, en particulier, l'identification, la production, l'optimisation et l'utilisation de nouveaux polynucléotides et polypeptides dans le domaine du diagnostic des infections sur matériel étranger (prothèses articulaires par exemple), infections
15 impliquant *S. aureus* et/ou *S. epidermidis*.

Des centaines de milliers de prothèses articulaires sont posées annuellement dans le monde (Lew et Waldvogel. 1997. Osteomyelitis. N Engl J Med 336:999-1007). Les infections sur prothèses articulaires (en abrégé, IPA) constituent, à ce
20 jour, un problème majeur de santé publique. Le diagnostic d'une IPA repose sur un faisceau d'arguments cliniques, paracliniques et microbiologiques. Actuellement, aucun de ces éléments pris isolément ne peut apporter de diagnostic formel. La symptomatologie clinique peut parfois suffire à
25 affirmer l'infection (fistule) et, dans la grande majorité des cas, elle a comme rôle fondamental d'alerter le clinicien et de lui permettre d'initier les examens complémentaires qui vont amener le diagnostic.

Malgré des progrès considérables enregistrés au cours
30 de ces dernières années, les IPA restent une complication fréquente, avec des taux de 0,3 à 1,8% pour les prothèses totales de hanche (Berbari et al., 1998, Clin Infect. Dis., 27:1247-1254 ; Lidgren. 2001. Joint prosthetic infections: a success story. Acta Othop Scand 72:553-

556) et de 0,5 à 5% pour les prothèses totales du genou (Bengtson et Knutson. 1991. The infected knee arthroplasty. A 6-year follow-up of 357 cases. Acta Othop Scand 62:301-311 ; Eveillard et al. 2002. Risque infectieux après implantation de prothèses de genou. Etude des infections profondes pour une série
5 continue de 210 prothèses totales de genou en première intention. B E H n°13) .

L'IPA apparaît donc être une complication redoutable, ayant pour conséquences non seulement la nécessité d'une ou plusieurs ré-interventions et d'une antibiothérapie au long cours, mais aussi un handicap prolongé, un risque
10 d'amputation et même de décès, d'où l'importance pour le patient d'un diagnostic fiable et précoce.

Les staphylocoques

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques (cocci) à Gram positif, immobiles, non sporulés, à catalase
15 positive et oxydase négative. *Staphylococcus aureus* se distingue généralement des autres espèces de staphylocoques existantes par la production d'une enzyme de type coagulase.

Le réservoir naturel de *S. aureus* est l'homme et les
20 animaux à sang chaud. Le site de colonisation préférentielle chez l'homme est la muqueuse nasale : jusqu'à 30% des adultes hébergent *S. aureus* de façon permanente dans leurs narines, et 50% de façon intermittente. A partir de ce site de portage, *S. aureus*
25 colonise la peau et, en particulier, les zones humides (aisselle, périnée) et les mains. *S. aureus* est aussi retrouvé en petites quantités dans l'intestin. Enfin, l'environnement immédiat de l'homme est également une source de contamination potentielle, du fait de la
30 persistance de *S. aureus* après son élimination dans le milieu extérieur.

S. aureus est responsable d'infections très diverses (infections telles que folliculites, impétigo, furoncles,

anthrax, panaris, cellulites, sinusites ou otites). Ces infections peuvent se compliquer par extension loco-régionale ou par diffusion hématogène des bactéries. *S. aureus* est ainsi responsable de septicémies, d'endocardites, de pneumopathies, d'ostéomyélites, d'arthrites et de méningites. Ces infections peuvent engager le pronostic vital par elles-mêmes (par exemple, atteinte d'une valve cardiaque) ou lors de choc toxique associé.

10 *S. epidermidis* représente avec les autres staphylocoques le principal commensal de la peau avec une densité de colonisation plus dense au niveau des zones humides. La transmission intra- ou interhumaine s'opère généralement par contact direct (manuportage). Plus
15 rarement, elle peut être indirecte à partir d'une source environnementale (vêtements, draps, matériels médicaux).

S. epidermidis est, de loin, le staphylocoque le plus fréquemment isolé dans les infections sur matériel étranger.

20 Infections à staphylocoques sur matériel étranger

Les staphylocoques sont les principaux agents des IPA et des autres infections sur matériels étrangers. Ce sont les germes les plus fréquemment retrouvés, puisqu'ils représentent jusqu'à 75% des bactéries isolées, *S. aureus*
25 et *S. epidermidis* étant les espèces prévalentes.

D'une façon générale, les IPA et autres infections sur matériel étranger dues à *S. aureus* sont plus souvent aiguës et suppuratives, en rapport avec la production de nombreuses enzymes et toxines par cette espèce (Nair et al. 2000.

30 **Advances in our understanding of the bone and joint pathology caused by *Staphylococcus aureus* infection. Rheumatology (Oxford) 39:821-834).**

Les infections staphylococciques sur matériel étranger se distinguent clairement des infections hors

matériel étranger (par exemple, septicémies, méningites, sinusites, otites...), par l'organisation des bactéries sous forme de biofilm (Costerton, et al. 1999. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections**. *Science* 284:1318-22) décrit chez de nombreux
5 staphylocoques, notamment *S. aureus* et étudié surtout chez *S. epidermidis* (Tormo MA, Marti M, Valle J, Manna AC, Cheung AL, Lasa I et Penades JR. 2005. **SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development**. *J Bacteriol*; 187:2348-56.)). Le biofilm est une structure tridimensionnelle complexe associée au matériel
10 étranger et où les cellules bactériennes sont enveloppées dans une matrice extracellulaire de nature polysaccharidique appelée slime ou glycocalyx (Davey et O'Toole. 2000. **Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:847-867). Comparativement à leurs
15 congénères vivant sous forme libre (ou "planctonique"), ces bactéries sont dans un état de quiescence marqué par une faible activité métabolique (Yao et al. 2005. **Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms**. *J Infect Dis* 191:289-298) .

Les infections sur matériel étranger, y compris les IPA, associées à la formation de biofilm présentent donc un certain nombre de caractéristiques qui les distinguent totalement des infections hors matériel étranger. En effet,
25 ces infections sont le plus souvent pauci-bactériennes (faible nombre de bactéries) et volontiers polymicrobiennes (association de plusieurs espèces). Comme indiqué plus haut, dans les infections sur matériel étranger, les bactéries ont un métabolisme très ralenti qui
30 les maintient dans un état proche de la dormance, et les gènes qu'elles expriment sont différents de ceux mis en action chez les formes planctoniques (Yao et al. 2005 [déjà cité]).

L'état de dormance des bactéries et la présence du biofilm réduisent considérablement la réaction inflammatoire et l'attraction des cellules immunitaires au site de l'infection (Vuong et al. 2004. Crucial role for exopolysaccharide modification
5 in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. J. Biol. Chem. 279, 52:54881-54886; Fux et al. 2003. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. Expert Rev Anti Infect Ther. 1:667-83). La présence d'une réponse immunitaire de type IgA est également tout à fait surprenante considérant la localisation de l'infection,
10 c'est-à-dire le matériel étranger implanté. Enfin, pour les mêmes raisons, les bactéries sont en grande partie protégées de l'action des antibiotiques (Costerton et al. 1995 [déjà cité]).

Diagnostic et suivi des IPA à staphylocoques

15 Diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique d'infection à staphylocoque est, aujourd'hui, quasi exclusivement direct, par mise en évidence de la bactérie à partir de prélèvements pertinents. L'examen microscopique permet la
20 recherche de cocci réguliers, à Gram positif, groupés en amas. Cet examen est très peu sensible et ne fournit aucune indication sur l'espèce en cause. L'interprétation du résultat obtenu lors de ce diagnostic direct reste toutefois soumise aux contaminations éventuelles puisque les
25 staphylocoques sont des contaminants fréquents.

Diagnostic sérologique

Le diagnostic indirect d'infection staphylococcique par recherche des anticorps circulants est aujourd'hui très peu développé et ne concerne que le diagnostic de certaines
30 infections sévères à *S. aureus* hors matériel étranger : endocardites, septicémies, infections ostéo-articulaires hématogènes (Söderquist et al. 1993. Staphylococcal alpha toxin in septicemic patients; detection in serum, antibody response and production in isolated strains.

Serodiagn Immunother Infect Dis 5:139-144 ; Nordin et al. 1995. Antibody response in patients with osteomyelitis of the mandible. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 79:429-435 ; Kancierski et al. 1996. Serum antibody response to *Staphylococcus aureus* enterotoxins and TSST-1 in patients with septicaemia. J Med Microbiol 44:171-177 ; Colque-Navarro et al. 1998. Antibody response in *Staphylococcus aureus* septicemia – a prospective study. J Med Microbiol 47:217-225 ; Colque-Navarro & Möllby. 1999. Usefulness of staphylococcal serology. J Med Microbiol 48:107-109 ; Ellis et al. 2003. Role of staphylococcal enterotoxin A in a fatal case of endocarditis. J Med Microbiol 52:109-112). On notera que US 6 703 492, US 6 380 370 et WO 01/34809 proposent des outils de diagnostic sérologique pour la mise en évidence de *S. epidermidis* et indiquent, certes, que ce germe affecte, notamment, les prothèses et cathéters, mais l'enseignement de ces brevets s'applique, en fait, aux infections hors matériel étranger.

Les tests actuels reposent sur la recherche d'anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques de *S. aureus* ou produits à partir de *S. aureus* : anticorps anti- α -toxine (ou antistaphylolysines alpha), anti-acide β -ribitol téichoïque, anti-entérotoxines et anti-toxine 1 de choc toxique staphylococcique (anti-TSST1), et anticorps anti-capsulaires ; la détection des anticorps se fait par inhibition d'hémolyse, électrosynérèse ou ELISA (Bornstein et al. 1992. Immune response to staphylococcal toxins and ribitol teichoic acid in *Staphylococcus aureus* infections. Med Microbiol Lett 1:111-119 ; Christensson et al. 1993. Diagnosing *Staphylococcus aureus* endocarditis by detecting antibodies against *S. aureus* capsular polysaccharides types 5 and 8. J Infect Dis 163:530-533 ; Kancierski et al. 1996 [déjà cité]). Ces tests sont globalement peu sensibles et peu spécifiques, et donnent des résultats variables selon les souches responsables des infections, notamment en fonction des toxines qu'elles produisent (par exemple : réponse plus forte pour les souches entérotoxines B et/ou

C positives que pour les souches entérotoxine A et/ou TSST1 positives) (Kancierski et al. 1996 [déjà cité]). Enfin, il n'existe pas à ce jour de tests utilisant des polypeptides et permettant d'identifier la classe des anticorps produits, et notamment s'il s'agit d'IgG ou d'IgA.

En ce qui concerne l'IPA, il est essentiel de pouvoir la diagnostiquer avec certitude. En effet, le traitement d'une IPA, lourd et coûteux, est associé à un retentissement fonctionnel important et n'est pas dénué de risque vital. En général, le traitement consiste en un débridement chirurgical extensif et méticuleux associé à une antibiothérapie adaptée et prolongée ; les principales options chirurgicales sont l'échange en un temps de la prothèse, le débridement avec rétention de la prothèse et la réimplantation de la prothèse en deux temps, ce qui nécessite des temps d'hospitalisation plus longs (Garvin et Hanssen. 1995. Current concepts review. Infection after total hip arthroplasty. Past, present, and future. J Bone Joint Surg 77-A:1576-1588). La mortalité associée à l'intervention chirurgicale pour IPA est de 0,4 à 1,2% pour les patients de 65 ans et de 2 à 7% pour les patients de 80 ans (Lentino. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. Clin Infect Dis 36:1157-1161).

Ainsi, aucune des méthodes de diagnostic actuelles n'a recours à l'utilisation d'antigène purifié, spécifique et sensible, pour mettre en évidence une infection à *S. aureus* et/ou à *S. epidermidis* sur prothèse articulaire ou matériel étranger. Par ailleurs, les méthodes sérologiques existantes ne permettent ni de réaliser de suivis thérapeutiques ni de réaliser des diagnostics post-implantatoires.

Il existe, dans ce domaine, un très grand besoin en une technique de diagnostic sérologique, spécifique et sensible, d'infection "naturelle" afin de réaliser des

tests rapides, peu coûteux et non invasifs. Idéalement ces tests devraient permettre d'identifier *S. aureus* et/ou *S. epidermidis* comme étant le germe en cause, germe dont le pouvoir de destruction tissulaire est très important.

5 Il est précisé que l'expression "infection naturelle" est utilisée par opposition à "hyperimmunisation" ou "immunisation" par exemple de type vaccin. L'immunisation, ou vaccination, consiste en effet en des injections qui renforcent le système de défense du corps ou système
10 immunitaire contre certaines infections chez l'homme ou chez l'animal. En général, les injections contiennent des formes atténuées ou inactives de certains microorganismes. La vaccination stimule le système immunitaire afin qu'il produise des anticorps capables de fixer lesdits
15 microorganismes. Il existe deux types de vaccin – les vaccins vivants et les vaccins morts ou inactivés. Un vaccin vivant est réalisé à partir d'une forme atténuée du microorganisme. Un vaccin inactivé ou mort est réalisé à partir du microorganisme tué ou de fragments de celui-ci
20 (protéines, sucres, lipides, etc...) ou encore des protéines recombinantes qui miment les protéines naturelles dudit microorganisme (voir par exemple Eloït M., 1998. **Vaccins traditionnels et vaccins recombinants**. INRA Prod. Anim., 11, 5-13). Les quantités de protéines utilisées pour la vaccination sont très variables
25 mais comprises entre 10 microgrammes et 50 milligrammes par dose. Ces quantités ne sont en rien comparables à la quantité d'une protéine donnée présente lors d'une infection "naturelle", quantité qui est bien inférieure. Ainsi, la probabilité que cette protéine soit présentée au
30 système immunitaire est donc considérablement plus faible. Ceci est d'autant plus avéré lorsqu'il s'agit d'une infection sur matériel étranger par une bactérie formant un biofilm protecteur (voir plus haut).

La difficulté d'identifier des antigènes révélant un processus infectieux est attestée par des études effectuées dans le laboratoire de la Déposante qui ont montré que de nombreux antigènes de *S. aureus* et/ou *S. epidermidis*, dont
5 des exemples sont donnés plus loin, ne sont pas des marqueurs d'infection, les témoins répondant dans les mêmes proportions que les malades avérés. Sur les quelques 2700 gènes que comporte le génome de la souche de *S. aureus* et/ou *S. epidermidis*, la Déposante a identifié un antigène
10 marqueur d'infection sur prothèse articulaire ou autre matériel étranger, dont l'utilisation est à ce jour inconnue en sérologie.

L'utilisation de cet antigène pourrait également permettre un diagnostic précoce d'IPA et, donc, éviter une
15 prise en charge chirurgicale systématique à un stade d'infection débutante. Ceci pourrait être réalisé par un suivi sérologique longitudinal des patients, c'est-à-dire un suivi sur une période de temps substantielle, après pose de prothèse (diagnostic post-implantatoire), notamment chez
20 les patients présentant un risque élevé d'IPA.

Enfin, dans l'avenir, en cas de développement d'approches vaccinales visant à prévenir les IPA staphylococciques, notamment, mais non exclusivement, celles dues à *S. aureus* et/ou *S. epidermidis*, la conduite
25 de tests sérologiques sera indispensable pour détecter les échecs de vaccination.

La présente invention a pour objectif de résoudre les problèmes posés par l'absence de tests sérologiques permettant la mise en évidence d'une infection à *S. aureus*
30 et/ou *S. epidermidis* sur matériel étranger, notamment sur prothèse articulaire, par la détection d'anticorps circulants présents en faible quantité dans le sérum,

anticorps produits lors d'une infection naturelle par des bactéries protégées du système immunitaire par un biofilm.

L'invention a, pour objectif supplémentaire, de permettre une analyse plus précise et plus complète de l'infection grâce à la détection des différents isotypes d'anticorps spécifiques des polypeptides.

Définitions

Les définitions suivantes sont données afin de faciliter la compréhension de certains termes utilisés dans cette description.

On entend par "polynucléotide" un polyribonucléotide ou un polydésoxyribonucléotide qui peut être un ADN ou un ARN modifié ou non.

Le terme polynucléotide inclut, sans limitation, un ADN simple brin ou double brin, un ADN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brin, un ADN qui est un mélange de régions simple brin, double brin et/ou triple brin, un ARN simple brin ou double brin, un ARN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brin et les molécules hybrides comprenant un ADN et un ARN qui peuvent comprendre des régions simple brin, double brin et/ou triple brin ou un mélange de régions simple brin et double brin. Le terme polynucléotide peut aussi comprendre un ARN et/ou un ADN comprenant une ou plusieurs régions triple brin. Les brins dans de telles régions peuvent provenir de la même molécule ou de molécules différentes. Par conséquent, les ADN ou ARN avec des squelettes modifiés pour la stabilité ou d'autres raisons sont inclus dans le terme polynucléotides. On entend également par polynucléotide, les ADN et ARN contenant une ou plusieurs bases modifiées. On entend par base modifiée, par exemple, les bases inhabituelles telles

que l'inosine. Le terme polynucléotide vise également les polynucléotides de forme modifiée chimiquement, enzymatiquement ou métaboliquement. Les polynucléotides comprennent également les polynucléotides courts tels que
5 les oligonucléotides.

On entend par "polypeptide" un peptide, un oligopeptide, un oligomère ou une protéine comprenant au moins deux acides aminés joints l'un à l'autre par une liaison peptidique normale ou modifiée.

10 Le terme polypeptide comprend les chaînes courtes, appelées peptides, oligopeptides et oligomères, et les chaînes longues, appelées protéines.

Un polypeptide peut être composé d'acides aminés autres que les 20 acides aminés codés par les gènes
15 humains. Un polypeptide peut également être composé d'acides aminés modifiés par des processus naturels, tels que le processus de maturation post-traductionnel ou par des procédés chimiques, qui sont bien connus de l'homme du métier. Le même type de modification peut être présent à
20 plusieurs endroits du polypeptide et n'importe où dans le polypeptide : dans le squelette peptidique, dans la chaîne d'acides aminés ou encore aux extrémités carboxy- ou amino-terminales.

Un polypeptide peut être ramifié suite à une
25 ubiquitination ou être cyclique avec ou sans ramification. Ce type de modifications peut être le résultat de processus de post-traduction naturel ou synthétique, qui sont bien connus de l'homme du métier.

On entend, par exemple, par modifications d'un
30 polypeptide, l'acétylation, l'acylation, l'ADP-ribosylation, l'amidation, la fixation covalente de flavine, la fixation covalente d'un hème, la fixation covalente d'un nucléotide ou d'un dérivé nucléotidique, la

fixation covalente d'un lipide ou d'un dérivé lipidique, la fixation covalente d'un phosphatidylinositol, la réticulation covalente ou non-covalente, la cyclisation, la formation de pont disulfure, la déméthylation, la formation de cystéine, la formation de pyroglutamate, la formylation, la gamma-carboxylation, la glycosylation, la formation d'ancre au GPI, l'hydroxylation, l'iodisation, la méthylation, la myristoylation, l'oxydation, le processus protéolytique, la phosphorylation, la prénylation, la racémisation, la sénéloylation, la sulfatation, l'addition d'acides aminés telles que l'arginylation ou l'ubiquitination (PROTEINS STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993) and Wold, F., Posttranslational Protein Modifications : Perspectives and Prospects, pgs 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990) and Rattan et al., Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)) .

On entend par "pourcentage d'identité" entre deux séquences polynucléotidiques ou polypeptidiques le pourcentage de nucléotides ou d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Les comparaisons entre deux séquences polynucléotidiques ou polypeptidiques sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par "fenêtre de comparaison" pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. Cette comparaison peut être réalisée grâce à un programme, par exemple le programme EMBOSS-Needle (alignement global

Needleman-Wunsch) à l'aide de la matrice BLOSUM62/Open Gap 10.0 et Extension Penalty de 0,5 (Needleman et Wunsch (1970). J. Mol. Biol. 48, 443-453 et Kruskal, J.B. (1983), An overview of sequence comparison, In D. Sankoff and J.B. Kruskal, (ed), Time warps, strind edits and macromolecules : the theory and practice of sequence comparison, pp. 1-44 Addison Wesley) .

Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou l'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100.

Un polynucléotide ayant, par exemple, une identité d'au moins 95% avec le polynucléotide ID SEQ N°1 est donc un polynucléotide comportant, au plus, 5 nucléotides modifiés sur 100 nucléotides, par rapport à ladite séquence. En d'autres termes jusqu'à 5% des nucléotides de la séquence ID SEQ N°1 peuvent être délétés ou substitués par un autre nucléotide, ou jusqu'à 5% du nombre total de nucléotides de la séquence ID SEQ N°1 peuvent être insérés dans ladite séquence. Ces modifications peuvent être positionnées aux extrémités 3' et/ou 5', ou à un endroit quelconque entre ces extrémités, en un seul ou plusieurs emplacements.

Par analogie, un polypeptide ayant, par exemple, une identité d'au moins 95% avec le polypeptide ID SEQ N°2 est un polypeptide comportant, au plus, 5 acides aminés modifiés sur 100 acides aminés, par rapport à ladite séquence. En d'autres termes jusqu'à 5% des acides aminés dans la séquence ID SEQ N°2 peuvent être délétés ou substitués par un autre acide aminé ou jusqu'à 5% du nombre total d'acides aminés de la séquence ID SEQ N°2 peuvent être insérés dans ladite séquence. Ces altérations de la séquence peuvent être situées aux positions amino et/ou

carboxy-terminales de la séquence d'acides aminés ou à un endroit quelconque entre ces positions terminales, en un ou plusieurs emplacements. (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome
5 Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993 ; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994 ; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987) .

La "similarité" est, quant à elle, calculée de la
10 même façon que l'identité, excepté que les acides aminés non identiques, mais présentant des caractéristiques physico-chimiques communes, sont considérés comme identiques.

On entend par "fragment de polypeptide" un
15 polypeptide comprenant au moins "n" acides aminés consécutifs issus du polypeptide ID SEQ N°2, où, selon les séquences, n sera égal à 7 acides aminés ou plus (par exemple, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50 ou plus acides aminés). Préférentiellement, lesdits fragments
20 comportent un épitope de la séquence ID SEQ N°2. Ces épitopes de type B ou T peuvent être déterminés par un logiciel (par exemple, PEOPLE [Alix, 1999], PREDITOP [Pellequer et Westhof, 1993] ou TEST [Zao et al., 2001]) ou expérimentalement par des techniques classiques [par exemple, épitope mapping
25 (cartographie d'épitope) ou protéolyse ménagée].

On entend par "fragment de polynucléotide" un polynucléotide comprenant au moins "n" nucléotides consécutifs issus du polynucléotide ID SEQ N°1, où, selon les séquences, n sera égal à 21 nucléotides ou plus (par
30 exemple, 22, 23, 24, 25, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 90, 120, 150 ou plus nucléotides).

On entend par "cellule hôte" une cellule qui a été transformée ou transfectée, ou est capable de

transformation ou de transfection, par une séquence polynucléotidique exogène.

On entend par "milieu de culture" le milieu dans lequel on purifie le polypeptide de l'invention. Ce milieu
5 peut être constitué par le milieu extracellulaire et/ou le lysat cellulaire. Des techniques bien connues de l'homme du métier permettent également à ce dernier de redonner la conformation active au polypeptide, si la conformation dudit polypeptide a été altérée lors de l'isolation ou de
10 la purification.

On entend par "fonction" l'activité biologique d'un polypeptide ou d'un polynucléotide.

La fonction d'un polypeptide conforme à l'invention est celle d'un antigène de *Staphylococcus aureus* et/ou de
15 *Staphylococcus epidermidis*, et la fonction d'un polynucléotide conforme à l'invention est celle de coder ce polypeptide. La fonction d'une combinaison d'antigènes est de permettre d'établir un diagnostic d'une infection sur matériel étranger et, en particulier, sur prothèse
20 ostéoarticulaire, mais aussi de réaliser des suivis post-implantatoire, des suivis thérapeutiques et, enfin, de préciser s'il s'agit d'une infection active ou aiguë, par exemple, l'utilisation de la détection de différents isotypes d'anticorps.

On entend par "antigène" tout composé qui, seul ou en association avec un adjuvant ou porteur, est capable d'induire une réponse immunitaire spécifique. Cette définition comprend également tout composé présentant une analogie structurale avec ledit antigène capable d'induire
25 une réponse immunologique dirigée contre ledit antigène.
30

On entend par "analogie structurale" une analogie aussi bien de la structure primaire (séquence) que de la structure secondaire (éléments structuraux), de la

structure tertiaire (structure tridimensionnelle) ou de la structure quaternaire (association de plusieurs polypeptides dans un même complexe) (BIOCHEMISTRY, 4ème Ed, L. Stryer, New York, 1995) .

5 On entend par "variant" d'un polynucléotide dit initial ou d'un polypeptide dit initial, respectivement, un polynucléotide ou un polypeptide qui en diffère par au moins un nucléotide ou un acide aminé, mais qui garde les mêmes propriétés intrinsèques, c'est-à-dire la même
10 fonction.

 Une différence dans la séquence polynucléotidique du variant peut altérer ou non la séquence d'acides aminés du polypeptide qu'il code, par rapport à un polypeptide initial. Néanmoins, par définition, ces variants doivent
15 conférer la même fonction que la séquence polynucléotidique initiale, par exemple, coder un polypeptide ayant une fonction antigénique.

 Le polynucléotide ou le polypeptide variant diffère généralement du polynucléotide initial ou du polypeptide
20 initial par une (ou plusieurs) substitution(s), addition(s), délétion(s), fusion(s) ou troncation(s) ou plusieurs de ces modifications, prises en combinaison. Un variant non-naturel d'un polynucléotide initial ou d'un polypeptide initial peut être obtenu, par exemple, par
25 mutagenèse dirigée ou par synthèse directe.

 On définit comme "séquence polynucléotidique complémentaire à la séquence polynucléotidique" un polynucléotide qui peut être hybridé avec cette séquence polynucléotidique dans des conditions stringentes.

30 On entend généralement, mais pas nécessairement, par "conditions stringentes" les conditions chimiques qui permettent une hybridation lorsque les séquences polynucléotidiques ont une identité d'au moins 80%.

Ces conditions peuvent être obtenues selon les méthodes bien connues de l'homme du métier.

On entend par "anticorps" les anticorps monoclonaux, polyclonaux, chimériques, simple chaîne, humanisés ainsi
5 que les fragments Fab, incluant les produits d'un Fab ou d'une banque d'expression d'immunoglobulines. Un anticorps immunospécifique peut être obtenu par administration à un animal d'un polypeptide donné suivie d'une récupération des anticorps produits par ledit animal par extraction depuis
10 ses fluides corporels. On peut également administrer à l'animal un variant dudit polypeptide, ou des cellules hôtes exprimant ce polypeptide.

Le terme "immunospécifique" appliqué au terme anticorps, vis-à-vis d'un polypeptide donné, signifie que
15 l'anticorps possède une meilleure affinité pour ce polypeptide que pour d'autres polypeptides connus de l'art antérieur.

On entend par "molécules immunospécifiques" par exemple, des récepteurs de cellules T (TCR) comme récemment
20 décrit (Li Y, Moysey R, Molloy PE, Vuidepot AL, Mahon T, Baston E, Dunn S, Liddy N, Jacob J, Jakobsen BK, Boulter JM. Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display. Nat Biotechnol. 2005, 23:349-54) ou des molécules caractérisées par leur fixation spécifique à un polypeptide donné, par exemple de séquence ID SEQ N°2,
25 à un fragment ou à un variant de ce polypeptide. Ces molécules peuvent être, par exemple sélectionnées par évolution dirigée (voir, par exemple, Conrad U, Scheller J. Considerations on antibody-phage display methodology. Comb Chem High Throughput Screen. 2005, 8:117-26). On entend par "fixation spécifique" d'une molécule
30 à un polypeptide, par exemple de séquence ID SEQ N°2, ou à un fragment ou à un variant de ce polypeptide, une interaction de ladite molécule avec ledit polypeptide,

fragment ou variant, présentant une affinité de l'ordre de 10^6M , 5.10^6M , 10^7M , 5.10^7M , 10^8M , 5.10^8M , 10^9M ou supérieure.

Par "affinité", on entend à la fois une complémentarité structurale et une complémentarité des
5 liaisons de faible énergie entre deux molécules au sens d'une définition communément admise (voir, par exemple, Klotz IM. *Ligand-protein binding affinities*. In *Protein Function, a Practical Approach* (T. E. Creighton, Ed.). 1989; 25-35. IRL Press, Oxford, ou encore Ajay, Murcko MA. *Computational methods to predict binding free energy in ligand-receptor complexes*.
10 *J Med Chem*. 1995 ; 38:4953-67). L'affinité peut être mesurée par les techniques classiques de la biochimie (ELISA, compétition, fluorescence...) bien connues de la personne du métier.

Par sérum "positif" on entend un sérum contenant des anticorps, produits à la suite d'une infection à *S. aureus*
15 et/ou *S. epidermidis* sur prothèse articulaire, identifiés par leur liaison avec les polypeptides (antigènes) de l'invention.

On entend par "sensibilité" la proportion de malades infectés, diagnostiqués selon l'art antérieur et donnés
20 positifs par le diagnostic selon l'invention.

On entend par "spécificité" la proportion de donneurs de sang, testés comme témoins, soumis au diagnostic selon l'invention et donnés négatifs par le diagnostic selon l'invention.

25 On entend par "amorces spécifiques" de courtes séquences nucléotidiques capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire.

On entend par "kit de diagnostic" un ensemble
30 contenant au moins l'un des produits selon l'invention (polypeptide, polynucléotide, anticorps, molécule immunospécifique) et un diluant convenable, rassemblés dans un contenant approprié fait dans un matériau adapté. Ce

contenant peut rassembler les différents moyens complémentaires nécessaires au test sérologique (par exemple, des réactifs marqués, des tampons, des solutions qui contiennent des ions adaptés, etc...) ainsi que les
5 instructions requises pour réaliser le test.

La présente invention répond aux objectifs qu'elle s'est fixés plus haut en apportant de nouveaux polynucléotides et de nouveaux polypeptides pour le diagnostic sérologique d'infections à *S. aureus* et/ou
10 *S. epidermidis* sur prothèse ou matériel étranger implanté dans le corps humain.

L'invention a pour objet l'utilisation, *in vitro*, du polypeptide de séquence ID SEQ N°2, d'un fragment ou d'un variant de ce polypeptide, de cellules hôtes comprenant des
15 vecteurs incluant un polynucléotide codant pour ledit polypeptide ou un variant dudit polypeptide, dans la production d'anticorps et le domaine du diagnostic *in vitro* de *S. aureus* et/ou *S. epidermidis*.

L'invention a également pour objet un kit de
20 diagnostic et une composition pharmaceutique, comprenant, comme principe actif :

- l'un au moins des polypeptides selon l'invention, ou
- l'un au moins des polynucléotides codant pour lesdits polypeptides selon l'invention, ou
- 25 • l'un au moins des anticorps immunospécifiques desdits polypeptides selon l'invention, ou
- l'une au moins des molécules immunospécifiques desdits polypeptides selon l'invention.

Utilisation des polypeptides

30 Comme indiqué plus haut, le laboratoire de la Déposante a constaté que tous les polypeptides issus de *S. aureus* ne permettent pas systématiquement de pronostiquer une infection à *S. aureus* et/ou à

S. epidermidis, sur matériel étranger, notamment sur prothèse articulaire (par exemple, les antigènes recombinants LytA (amidase), Trigger factor (prolyl isomérase) ou SrtA (sortase A) sont impropres à un tel pronostic).

La Déposante a, par contre, découvert, de façon tout à fait inattendue, qu'un tel pronostic était possible en utilisant un autre polypeptide issu de *S. aureus* qu'elle a spécifiquement identifié.

L'identification du polypeptide selon l'invention est le résultat d'un crible et d'études approfondies que les séquences issues des programmes de génomique de *S. aureus* ne laissaient pas envisager.

Ainsi, la présente invention a pour objet l'utilisation, dans la production d'anticorps et dans le domaine du diagnostic *in vitro* d'infections naturelles à *S. aureus* et/ou *S. epidermidis*, du polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2 (appelée polypeptide 5G1), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1

La présente invention vise également l'utilisation d'au moins un polypeptide comprenant :

a) un fragment de la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2 ayant la même fonction que ladite séquence, ou

b) une séquence d'acides aminés ayant au moins 60% d'identité, de préférence au moins 80% d'identité, et mieux au moins 90% d'identité, avec la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, ou avec le fragment de séquence défini sous a), et ayant la même fonction que ladite séquence.

Grâce aux polypeptides définis ci-dessus, l'invention permet la détection d'anticorps naturellement produits lors d'infections à *S. aureus* et/ou *S. epidermidis* sur prothèse articulaire.

L'invention vise, en outre, l'utilisation des polypeptides selon l'invention, pour détecter, périodiquement, *in vitro*, les anticorps dirigés contre *S. aureus* et/ou *S. epidermidis* et ainsi suivre l'évolution
5 de la pathologie et de l'effet d'un traitement appliqué à un patient. Les polypeptides sont utilisables comme sonde, car il s'agit de biomarqueurs naturels d'infection à *S. aureus* et/ou *S. epidermidis* sur prothèse articulaire.

Les échantillons biologiques testés peuvent être du
10 sang, de l'urine, de la salive, du liquide de ponction de sérologie (par exemple liquide céphalo-rachidien, liquide pleural ou liquide articulaire) ou l'un de leurs constituants (par exemple, le sérum).

Le diagnostic *in vitro* d'une infection à *S. aureus*
15 et/ou *S. epidermidis* est effectué, par exemple, par des tests classiques de réactions immunologiques, tels que l'ELISA ou le Western Blot. Ces tests utilisent l'un des polypeptides selon l'invention qui fixe, de manière spécifique, les anticorps immunosécifiques présents dans
20 les échantillons biologiques et produits lors d'une infection naturelle à *S. aureus* et/ou *S. epidermidis*.

Utilisation de vecteurs d'expression et de cellules hôtes

La présente invention a aussi pour objet
25 l'utilisation d'un polypeptide préparé par culture d'une cellule hôte comprenant un vecteur recombinant ayant, inséré, un polynucléotide codant pour ledit polypeptide.

De nombreux systèmes d'expression peuvent être utilisés comme, par exemple, les chromosomes, les épisomes,
30 les virus dérivés. Plus particulièrement, les vecteurs recombinants utilisés peuvent être dérivés de plasmides bactériens, de transposons, d'épisome de levure, d'éléments d'insertion, d'éléments chromosomiques de levures, de virus

tels que les *baculovirus*, les *papillonna virus* comme SV40, les *vaccinia virus*, les adénovirus, les *fox pox virus*, les *pseudorabies virus*, les rétrovirus.

5 Ces vecteurs recombinants peuvent également être des dérivés de cosmides ou de phagemides. La séquence polynucléotidique peut être insérée dans le vecteur recombinant d'expression par les méthodes bien connues de l'homme du métier.

10 Le vecteur recombinant peut comprendre des séquences polynucléotidiques de contrôle de la régulation de l'expression du polynucléotide ainsi que des séquences polynucléotidiques permettant l'expression et la transcription d'un polynucléotide selon l'invention et la traduction d'un polypeptide selon l'invention, ces
15 séquences étant choisies en fonction des cellules hôtes mises en oeuvre.

L'introduction du vecteur recombinant dans une cellule hôte peut être effectuée selon les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que la transfection par
20 phosphate de calcium, la transfection par lipides cationiques, l'électroporation, la transduction ou l'infection.

Les cellules hôtes peuvent être, par exemple, des cellules bactériennes, telles que des cellules de
25 streptocoques, de staphylocoques, d'*Escherichia coli* ou de *Bacillus subtilis* ; des cellules de champignons, telles que des cellules de levure et des cellules d'*Aspergillus* ; des cellules de *Streptomyces* ; des cellules d'insectes, telles que des cellules de *Drosophila S2* et de *Spodoptera Sf9* ;
30 des cellules animales, telles que les cellules CHO, COS, HeLa, C127, BHK, HEK 293 ou encore des cellules végétales.

Le polypeptide peut être purifié à partir des cellules hôtes, selon les méthodes bien connues de l'homme

du métier, telles que la précipitation à l'aide d'agents chaotropiques comme les sels, en particulier le sulfate d'ammonium, l'éthanol, l'acétone ou l'acide trichloroacétique, ou de moyens tels que l'extraction à l'acide, la chromatographie échangeuse d'ions, la chromatographie sur phosphocellulose, la chromatographie par interaction hydrophobe, la chromatographie d'affinité, la chromatographie sur hydroxylapatite ou les chromatographies d'exclusion.

10 Utilisation des polynucléotides

La présente invention a également pour objet l'utilisation, dans la production d'anticorps et dans le diagnostic d'une infection à *S. aureus* et/ou *S. epidermidis*, du polynucléotide comprenant la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1, codant pour le polypeptide ID SEQ N°2.

L'invention vise également l'utilisation d'au moins un polynucléotide comprenant :

a) un fragment de la séquence ID SEQ N°1 et ayant la même fonction que ladite séquence, ou

b) une séquence polynucléotidique ayant au moins 60% d'identité, de préférence au moins 80% d'identité, et mieux au moins 90% d'identité, avec la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1 ou avec le fragment de séquence tel que défini sous a), et ayant la même fonction que ladite séquence, ou

c) une séquence polynucléotidique complémentaire à la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1 ou au fragment de séquence défini sous a) ou à la séquence définie sous b).

Les polynucléotides de l'invention peuvent être obtenus par les méthodes standard de synthèse d'ADN ou d'ARN.

Les polynucléotides conformes à l'invention peuvent également comprendre des séquences polynucléotidiques comme

les séquences 5' et/ou 3' non-codantes, telles que, par exemple, des séquences transcrites, des séquences non-traduites, des séquences signal d'épissage, des séquences polyadénylées, des séquences de liaison avec des ribosomes
5 ou encore des séquences qui stabilisent l'ARNm.

Utilisation des anticorps selon l'invention

L'invention vise également l'utilisation d'anticorps, selon l'invention, pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques la présence d'antigènes de
10 *S. aureus* et/ou *S. epidermidis*.

L'invention vise, en outre, l'utilisation d'anticorps selon l'invention, pour détecter, périodiquement, *in vitro*, les antigènes de *S. aureus* et/ou *S. epidermidis* et ainsi suivre l'évolution de la pathologie et de l'effet d'un
15 traitement appliqué à un patient.

Les anticorps immunospécifiques peuvent être obtenus par administration d'un polypeptide selon l'invention, d'un de ses fragments, d'un analogue ou d'un fragment épitopique ou d'une cellule exprimant ce polypeptide, à un mammifère,
20 de préférence non humain, selon les méthodes bien connues de l'homme du métier.

Pour la préparation d'anticorps monoclonaux, on peut utiliser des méthodes usuelles de production d'anticorps, à partir de lignées cellulaires, telles que la technique des
25 hybridomes, la technique des triomes, la technique des hybridomes de cellules B humaines et la technique des hybridomes EBV.

Isotypes d'anticorps et affinité

Les immunoglobulines (ou anticorps) sont constituées
30 de deux chaînes polypeptidiques différentes : deux chaînes légères (L) d'isotypes [kappa] ou [lambda], et deux chaînes lourdes (H) d'isotypes [gamma], [alpha], [mu], [delta] ou [epsilon]. Ces quatre chaînes sont liées de façon covalente

par des ponts disulfure. Les deux types de chaînes H ou L possèdent des régions qui contribuent à la fixation des antigènes et sont très variables d'une immunoglobuline à une autre. Ces régions déterminent l'affinité des anticorps pour leur ligand.

Les isotypes des chaînes lourdes permettent de définir la classe de l'immunoglobuline ; il existe donc 5 isotypes d'anticorps (IgA, IgM, IgD, IgE et IgG). Des sous-classes, par exemple IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 sont définies par des différences de séquence de la chaîne lourde. Les différentes classes d'immunoglobulines ont des propriétés physicochimiques propres et leur synthèse dépend directement des phases et des niveaux d'activation de la réponse immunitaire.

Chez l'homme, les IgG représentent la principale classe d'immunoglobulines : leur concentration sérique chez l'adulte varie de 8 à 16 g/l. Leur demi-vie plasmatique est d'environ 3 semaines.

Les IgA constituent la deuxième classe d'immunoglobulines sériques, après les IgG, en terme de concentration (2 à 4 g/l). En revanche, elles représentent la classe prépondérante des immunoglobulines dans les sécrétions (sécrétions respiratoires, salivaires, digestives..., lait, colostrum, larmes). Sur le plan structural, les IgA ont la particularité de se présenter sous plusieurs formes moléculaires :

- dans le sérum, les IgA peuvent se présenter sous forme de monomères (forme prépondérante) ou sous forme de dimères associés à une chaîne J (chaîne de jonction). La chaîne J est un peptide riche en cystéine de 137 acides aminés (poids moléculaire : 15 kDa), d'origine plasmocytaire ; la sous-classe IgA1 est prépondérante dans le sérum ;

- dans les sécrétions, les IgA, appelées IgA sécrétoires, sont sous forme de dimères ; elles sont donc associées à une chaîne J, mais elles comportent également un composant sécrétoire. Les IgA produites par les lymphocytes B sont captées par les cellules épithéliales, par un récepteur (polyIgR) situé au pôle basal de la cellule. C'est pendant le transfert de l'IgA à travers la cellule épithéliale, vers le pôle apical de la cellule, que le composant sécrétoire (poids moléculaire : 70 kDa), ou pièce sécrétoire, est ajouté. Le rôle de la pièce sécrétoire est de protéger les IgA sécrétoires vis-à-vis des enzymes protéolytiques présents dans les sécrétions.

Comme les IgA, les IgM peuvent se présenter sous 2 formes moléculaires distinctes :

- une forme monomérique : c'est la forme sous laquelle les IgM sont synthétisées et insérées dans la membrane du lymphocyte B ;

- une forme pentamérique : c'est la forme sous laquelle les IgM sont sécrétées. Les 5 monomères de bases sont reliés par des ponts disulfures. De plus, une chaîne J relie l'extrémité de 2 monomères.

Les IgD représentent moins de 1 % des immunoglobulines sériques. Elles sont habituellement coexprimées avec les IgM à la surface des lymphocytes B où elles semblent jouer un rôle de récepteur pour les antigènes.

Chez un sujet sain, les IgE ne sont présentes qu'à l'état de traces.

Cinétique d'apparition des anticorps et affinité

La cinétique d'apparition d'anticorps spécifiques et d'un isotype donné est aujourd'hui encore mal comprise. D'une façon générale, les cellules B, dites naïves, synthétisent différents IgM qui constituent un large répertoire de molécules capables de fixer des antigènes

(Steven A. Frank., Immunology and Evolution of Infectious Disease. (2002), Princeton University Press, Princeton, USA). Ainsi, lors de la première exposition à un antigène, celui-ci va se fixer avec une faible affinité à différents IgM du système immunitaire. Cette interaction va néanmoins stimuler la division de la cellule B naïve correspondante. La division est d'autant plus rapide que l'affinité de l'IgM est forte, ce qui permet une sélection initiale des meilleurs clones. De plus, lors de la division, les réarrangements génétiques permettent l'augmentation de l'affinité des anticorps. La région constante des immunoglobulines change également afin de produire des IgG dans le système circulatoire et des IgA à la surface des muqueuses (Steven et Frank 2002. Immunology and Evolution of Infectious Disease. Princeton University Press, Princeton, USA) .

Il peut donc être déduit par l'homme de l'art que la présence d'une ou plusieurs classes d'anticorps et l'affinité particulière des anticorps ont différentes implications d'un point de vue du diagnostic médical dans la différenciation des infections récurrentes ou non, d'une infection active, aiguë, chronique, latente, et récente.

La détection d'une infection staphylococcique naturelle sur matériel étranger implanté dans le corps peut être complétée, selon l'invention, par une étape supplémentaire qui permet de confirmer au moins la présence *S. aureus*, en utilisant le polypeptide de séquence d'acides aminés de SEQ ID N°2 pour la détection d'isotypes d'anticorps à l'aide d'anticorps secondaires spécifiques desdits isotypes.

Plus précisément, en ayant recours à un anticorps secondaire reconnaissant spécifiquement les immunoglobulines de type G ou à un mélange d'immunoglobulines contenant au moins des anticorps reconnaissant spécifiquement les immunoglobulines de type G, l'invention permet de détecter la présence d'anticorps produits contre le polypeptide de séquence d'acides aminés de SEQ ID N°2, à la suite d'une infection naturelle à

S. aureus et/ou à *S. epidermidis* sur matériel étranger implanté dans le corps.

De plus, en ayant recours à un anticorps secondaire reconnaissant spécifiquement les immunoglobulines de type A, l'invention permet de détecter uniquement la présence d'anticorps produits contre le polypeptide de séquence d'acides aminés de SEQ ID N°2, à la suite d'une infection naturelle à *S. aureus* sur matériel étranger implanté dans le corps.

La combinaison des deux méthodes permet, dans certains cas, de confirmer la présence d'au moins *S. aureus*, comme cela sera plus explicite dans la suite.

Plus précisément, l'invention recourt à l'utilisation d'un mélange d'immunoglobulines contenant au moins des anticorps reconnaissant spécifiquement les immunoglobulines de type G, pour détecter la présence d'anticorps produits, en réaction au polypeptide de séquence d'acides aminés de SEQ N°2, à la suite d'une infection naturelle à *Staphylococcus aureus* et à *Staphylococcus epidermidis* sur matériel étranger implanté dans le corps.

Elle a également recours à l'utilisation d'un anticorps reconnaissant spécifiquement les immunoglobulines de type A pour détecter la présence d'anticorps produits, en réaction au polypeptide de séquence d'acides aminés de SEQ N°2, à la suite d'une infection naturelle à *Staphylococcus aureus* sur matériel étranger implanté dans le corps.

La combinaison des deux techniques permet de discerner les deux germes, comme cela sera plus explicite dans la suite.

Les kits

L'invention a également pour objet des kits de diagnostic *in vitro* comprenant, d'une part :

- l'un au moins des polypeptides conformes à l'invention, ou
- l'un au moins des polynucléotides codant pour lesdits polypeptides, ou
- 5 • l'un au moins des anticorps conformes à l'invention, ou
- l'une au moins des molécules immunospécifiques conformes à l'invention, ou
- ledit mélange d'anti-globulines conformes à l'invention, et, d'autre part, au moins un diluant (par exemple, un
- 10 tampon, une solution saline...).

Les vaccins

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, utilisable comme vaccin, renfermant à titre de principe actif au moins un des

15 polypeptide, polynucléotide, vecteur recombinant ou cellule hôte selon l'invention, et un excipient pharmaceutiquement acceptable (par exemple, une solution stérile aqueuse ou non, pouvant contenir un antioxydant ou un tampon ou un soluté rendant la composition isotonique pour les fluides

20 corporels).

Partie expérimentale

A) Protocoles d'obtention des antigènes

A.1. Clonage de la séquence codant pour le polypeptide ID SEQ N°2

25 Le gène codant pour la séquence du polypeptide, qui est un antigène, est obtenu par amplification par PCR à partir de l'ADN génomique des bactéries *Staphylococcus aureus* (souche MU50, ATCC 700699) en utilisant des amorces spécifiques de la séquence ID SEQ N°1. Ces amorces sont

30 choisies par l'homme de l'art de façon à encadrer la séquence d'ADN et à l'amplifier spécifiquement (par exemple ID SEQ N°1).

Le fragment correspondant, ainsi amplifié, est cloné dans un vecteur selon des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. Ce vecteur permet la production de la protéine clonée sous contrôle d'un promoteur inductible par l'isopropyl-thiogalactoside (IPTG). La protéine clonée correspond au polypeptide ID SEQ N°2.

A.2. Expression du polypeptide

Une souche d'*Escherichia coli* est transformée par les vecteurs d'expression précédemment décrits. Les bactéries sélectionnées sont mises à cultiver une nuit à 30°C sous agitation dans 30 ml de milieu Luria Bertani (LB, J. Miller, "A short Course in Bacterial Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992) contenant de l'ampicilline à une concentration finale de 100 µg/ml. Le lendemain, la culture est diluée au 1/50^{ème} dans un volume final de 1 litre de milieu LB additionné d'ampicilline à une concentration finale de 100 µg/ml qui est incubée à 30°C sous agitation. Lorsque la turbidité de la culture atteint une valeur d'absorbance à 600 nm (en abrégé, A600) d'environ 0,7, la production du polypeptide est induite par l'isopropyl-thiogalactoside (en abrégé, IPTG) à une concentration finale de 0,1 mM. Les bactéries sont récoltées par centrifugation (10 minutes à 1400xg et à 4°C) lorsque la turbidité de la culture atteint une A600 d'environ 1,5.

A.3. Purification du polypeptide 5G1 (ID SEQ N°2)

Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl 20 mM à pH 8,0 contenant du saccharose à 0,5 mM, puis traitées par du lysozyme (0,2 g/l) en présence d'acide éthylènediaminotétraacétique (EDTA) 12,5 mM, de DNase, RNase et PMSF. La suspension est incubée 30 minutes à 4°C puis centrifugée 10 minutes à 4°C

à 15500xg. Le culot est congelé à -20°C pendant au moins une nuit.

Après décongélation, les bactéries sont reprises dans un tampon Mes 25 mM à pH 5,5, puis soniquées 4 fois
5 20 secondes dans la glace. Après centrifugation à 15500xg à 4°C pendant 30 minutes, le surnageant est filtré sur membrane de porosité 0,22 µm. Le filtrat est alors déposé sur une colonne échangeuse de cation (par exemple, SP-Sépharose 12 ml, Amersham Biosciences). Après lavage de
10 la colonne, le polypeptide est élué par un gradient linéaire de 0 à 1 M de NaCl dans du tampon Mes 25 mM à pH 5,5 en 20 volumes de colonne. Les fractions contenant le polypeptide sont rassemblées et le polypeptide est précipité par du sulfate d'ammonium à une concentration
15 finale de 0,6 g/l. La solution est laissée au moins une nuit à 4°C puis centrifugée 30 minutes à 20800xg. Le culot est alors repris dans un volume le plus faible possible (en général 300 µl de tampon Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0 contenant du NaCl 100 mM puis déposé sur une colonne de gel
20 filtration, par exemple Superdex HR75-10/30, Amersham). Les fractions éluées contenant le polypeptide sont rassemblées et du glycérol est ajouté jusqu'à une concentration finale de 20%. Le polypeptide purifié est alors stocké à -20°C jusqu'à son utilisation dans les tests.

25 La concentration en polypeptide est déterminée spectrophotométriquement à partir des coefficients d'absorption calculés par la méthode de Pace (Pace et al. 1995. **How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Science 4, 2411-2423**). La pureté du polypeptide est vérifiée par
30 analyse par électrophorèse SDS-PAGE et par spectrométrie de masse.

B) Test de diagnostic *in vitro*

Il a été utilisé des sérums provenant de patients ayant eu une infection ostéoarticulaire documentée (collection du laboratoire) à *S. aureus* ou *S. epidermidis*.

5 Les sérums témoins correspondaient à des sérums de donneurs de sang (collection du laboratoire).

B.1. Protocole du test pour le polypeptide de séquence ID SEQ N°2 (ELISA)

La fixation des anticorps présents dans les sérums a
10 été évaluée par des tests ELISA. Les plaques ELISA sont
laissées pendant une nuit à 4°C en présence de 0,5 µg
d'antigène purifié (polypeptide recombinant 5G1) dans du
"tampon salin phosphate" (PBS). Après quatre lavages par du
PBS contenant du polyoxyéthylène sorbitan (Tween) à 0,05%,
15 les plaques sont saturées une heure à 37°C par du PBS
contenant 4% de sérum albumine bovine (abrégée en BSA)
(250 µl par puits). Quatre nouveaux lavages sont réalisés,
puis 100 µl de chaque sérum, à la dilution adéquate (soit
1/400^{ème} en IgG et 1/50^{ème} en IgA pour 5G1) dans du tampon
20 PBS contenant 4 % de BSA, sont ajoutés dans chaque puits.
La plaque est ensuite laissée à 25°C pendant 30 minutes.
Après quatre nouveaux lavages, des anticorps (secondaires)
de chèvre anti-immunoglobulines G ou A, humaines marqués à
la phosphatase alcaline (par exemple 170-6462, Biorad) sont
25 ajoutés et incubés pendant 30 minutes à 25°C après avoir
été dilués selon le protocole du fournisseur dans du tampon
PBS contenant 4 % de BSA. Quatre nouveaux lavages sont
réalisés puis 100 µl de substrat (phosphate de p-
nitrophényle), pNPP, par exemple A-3469, Sigma) sont
30 ajoutés. L'absorbance à 405 nm de chacun des puits est
mesurée après une incubation de 30 minutes à 37°C.

B.2. Résultats et interprétation

Les essais ont été réalisés sur un polypeptide recombinant issu de purifications indépendantes.

Exemple B.2.1 : Résultats obtenus en utilisant des anti-IgG ou anti-IgA comme anticorps secondaires :
déttection d'isotype d'anticorps dans les sérums (ELISA)

Des résultats types sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1 : Résultats (ELISA) obtenus en utilisant des anti-IgG comme anticorps secondaires

	Polypeptide 5G1
Proportion de sérums "positifs" parmi les 20 sérums de malades infectés par <i>S. aureus</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	40,0%
Proportion de sérums "positifs" parmi les 19 sérums de malades infectés par <i>S. epidermidis</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	44,0%
Proportion de sérums "négatifs" parmi les 88 sérums de donneurs de sang testés comme témoins	96,6%

Tableau 2 : Résultats (ELISA) obtenus en utilisant des anti-IgA comme anticorps secondaires

	Polypeptide 5G1
Proportion de sérums "positifs" parmi les 20 sérums de malades infectés par <i>S. aureus</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	30,0%
Proportion de sérums "positifs" parmi les 19 sérums de malades infectés par <i>S. epidermidis</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	0,0%
Proportion de sérums "négatifs" parmi les 89 sérums de donneurs de sang testés comme témoins	96,6%

5 Il en découle que le polypeptide selon l'invention peut être utilisé pour mettre en évidence des infections à *S. aureus* et/ou *S. epidermidis* sur des prothèses articulaires par la mise en évidence de certains isotypes d'anticorps.

10 Comme indiqué dans le tableau 2, l'utilisation du polypeptide permet de distinguer entre les espèces de staphylocoques. En effet, la mise en évidence d'anticorps d'isotype IgA n'est possible que dans le cas d'une infection à *S. aureus*. Ainsi, après avoir démontré
15 l'existence d'une infection staphylococcique (Tableau 1, révélation d'IgG), le polypeptide selon l'invention permet

de distinguer une infection à *S. aureus* d'une infection à *S. epidermidis* (Tableau 2, révélation d'IgA).

Exemple B.2.2 : Résultats obtenus lors de la
5 détection de plusieurs isotypes d'anticorps avec le
polypeptide 5G1 selon l'invention pour le diagnostic *in*
vitro d'IPA

La détection de plusieurs isotypes d'anticorps permet
d'augmenter la sensibilité de la méthode (Tableau 3).

10

Tableau 3 : Résultats (ELISA) obtenus en détectant
les anticorps grâce à différents anticorps secondaires

Anticorps secondaire utilisé	IgA	IgG	IgG et A
Proportion de sérums "positifs" parmi les 20 sérums de malades infectés par <i>S. aureus</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	40%	45%	50%
Proportion de sérums "négatifs" parmi les 89 sérums de donneurs de sang testés comme témoins	89%	93%	91%

15 En conclusion, la présente invention décrit des
polypeptides choisis, quant à leur sensibilité et à leur
spécificité, parmi un très grand nombre, pour une
utilisation comme sonde (antigène) dans des tests
sérologiques. L'invention permet, sans intervention

chirurgicale, le diagnostic d'infections naturelles à *S. aureus* et/ou *S. epidermidis*, sur matériel étranger, tel que prothèses ostéo-articulaires.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques, la présence d'anticorps produits
5 à la suite d'une infection à *S. aureus* et/ou *S. epidermidis* sur matériel étranger implanté dans le corps, du polypeptide de séquence d'acides aminés ID SEQ N°2.

2. Utilisation pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques, la présence d'anticorps produits
10 à la suite d'une infection à *S. aureus* et/ou *S. epidermidis* sur matériel étranger implanté dans le corps, d'au moins un polypeptide comprenant :

a) un fragment de la séquence d'acides aminés telle que définie selon la revendication 1 et ayant la même
15 fonction que ladite séquence, ou

b) une séquence d'acides aminés ayant au moins 60% d'identité avec la séquence d'acides aminés telle que définie selon la revendication 1 ou avec un fragment de séquence tel que défini sous a), et ayant la même fonction
20 que ladite séquence.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit polypeptide est préparé par culture d'une cellule hôte comprenant un vecteur recombinant ayant, inséré, un polynucléotide codant pour
25 ledit polypeptide et par isolement dudit polypeptide du milieu de culture.

4. Utilisation selon la revendication 3, quand elle dépend de la revendication 1, caractérisée en ce que le polynucléotide est de séquence ID SEQ N°1.

30 5. Utilisation pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques, la présence d'anticorps produits à la suite d'une infection à *S. aureus* et/ou *S. epidermidis* sur matériel étranger implanté dans le corps, dudit polynucléotide de séquence ID SEQ N°1.

35 6. Utilisation pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques, la présence d'anticorps produits à la suite d'une infection à *S. aureus* et/ou *S. epidermidis*

sur matériel étranger implanté dans le corps, d'au moins un polynucléotide comprenant

a) un fragment de la séquence telle que définie selon la revendication 5 et ayant la même fonction que ladite
5 séquence, ou

b) une séquence polynucléotidique ayant au moins 60% d'identité avec une séquence polynucléotidique telle que définie selon la revendication 5 ou avec un fragment de séquence tel que défini sous a), et ayant la même fonction
10 que ladite séquence, ou

c) une séquence polynucléotidique complémentaire à une des séquences polynucléotidiques telles que définies selon la revendication 5 ou selon la revendication 6a) ou 6b).

15 7. Utilisation d'anticorps pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques, la présence d'antigènes issus d'une infection par *S. aureus* et/ou *S. epidermidis* sur matériel étranger implanté dans le corps, caractérisée en ce que lesdits anticorps sont immunospécifiques pour un
20 polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 3.

8. Kit de diagnostic pour l'utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'un desdits polypeptides ou l'un desdits polynucléotides codant pour lesdits polypeptides
25 associé à au moins un diluant.

9. Kit de diagnostic pour l'utilisation selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'un desdits anticorps associé à au moins un diluant.

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> ABAG

<120> Utilisation de la protéine 5G1 dans le diagnostic in vitro
d'infections à Staphylococcus aureus et/ou epidermidis

<130> B4002

<150> FR05 12459

<151> 2005-12-08

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 831

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(831)

<400> 1

tta	aaa	gta	gta	acg	acg	aat	tca	att	tta	tat	gat	atg	gct	aaa	aat	48
Leu	Lys	Val	Val	Thr	Thr	Asn	Ser	Ile	Leu	Tyr	Asp	Met	Ala	Lys	Asn	
1				5					10					15		

ggt	ggt	gga	gac	aac	gtc	gat	att	cat	agt	att	gta	cct	ggt	ggt	caa	96
Val	Gly	Gly	Asp	Asn	Val	Asp	Ile	His	Ser	Ile	Val	Pro	Val	Gly	Gln	
			20					25					30			

gat	cct	cat	gaa	tat	gaa	ggt	aaa	cct	aaa	gat	att	aaa	aag	tta	act	144
Asp	Pro	His	Glu	Tyr	Glu	Val	Lys	Pro	Lys	Asp	Ile	Lys	Lys	Leu	Thr	
		35					40					45				

gac	gct	gac	ggt	att	tta	tac	aac	gga	tta	aat	tta	gag	act	ggt	aac	192
Asp	Ala	Asp	Val	Ile	Leu	Tyr	Asn	Gly	Leu	Asn	Leu	Glu	Thr	Gly	Asn	
	50					55				60						

ggt	tgg	ttt	gaa	aaa	gcc	tta	gaa	cag	gct	ggt	aaa	tca	tta	aaa	gat	240
Gly	Trp	Phe	Glu	Lys	Ala	Leu	Glu	Gln	Ala	Gly	Lys	Ser	Leu	Lys	Asp	
65					70				75					80		

aaa	aaa	ggt	atc	gca	gta	tca	aaa	gat	ggt	aaa	cct	atc	tat	tta	aac	288
Lys	Lys	Val	Ile	Ala	Val	Ser	Lys	Asp	Val	Lys	Pro	Ile	Tyr	Leu	Asn	
				85					90					95		

ggt	gaa	gaa	ggc	aac	aaa	gat	aaa	caa	gat	cca	cac	gca	tgg	tta	agt	336
Gly	Glu	Glu	Gly	Asn	Lys	Asp	Lys	Gln	Asp	Pro	His	Ala	Trp	Leu	Ser	
			100					105					110			

tta	gat	aat	ggt	att	aaa	tac	gta	aaa	aca	att	caa	caa	aca	ttt	atc	384
Leu	Asp	Asn	Gly	Ile	Lys	Tyr	Val	Lys	Thr	Ile	Gln	Gln	Thr	Phe	Ile	
			115				120						125			

gat aac gac aaa aaa cat aaa gca gat tat gaa aag caa ggt aac aaa 432
Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
130 135 140

tac att gct caa ttg gaa aaa tta aat aat gac agt aaa gac aaa ttt 480
Tyr Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Asn Asn Asp Ser Lys Asp Lys Phe
145 150 155 160

aat gac att cca aaa gaa caa cgt gcc atg att aca agt gaa ggt gcc 528
Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
165 170 175

ttc aag tac ttc tca aaa caa tac ggt att aca cca ggt tat att tgg 576
Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
180 185 190

gaa att aac act gaa aaa caa ggt aca cct gaa caa atg aga caa gct 624
Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
195 200 205

att gag ttt gtt aaa aag cac aaa tta aaa cac tta tta gta gaa aca 672
Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
210 215 220

agt gtt gat aag aaa gca atg gaa agt tta tct gaa gaa acg aag aaa 720
Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
225 230 235 240

gat atc ttt ggt gaa gtg tac aca gat tca atc ggt aaa gaa ggc act 768
Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
245 250 255

aaa ggt gac tct tac tac aaa atg atg aaa tca aat att gaa act gta 816
Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Glu Thr Val
260 265 270

cac gga agc atg aaa 831
His Gly Ser Met Lys
275

<210> 2
<211> 277
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

Leu Lys Val Val Thr Thr Asn Ser Ile Leu Tyr Asp Met Ala Lys Asn
1 5 10 15

Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
20 25 30

Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
35 40 45

Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
 50 55 60

Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
 65 70 75 80

Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
 85 90 95

Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
 100 105 110

Leu Asp Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Gln Thr Phe Ile
 115 120 125

Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
 130 135 140

Tyr Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Asn Asn Asp Ser Lys Asp Lys Phe
 145 150 155 160

Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
 165 170 175

Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
 180 185 190

Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
 195 200 205

Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
 210 215 220

Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
 225 230 235 240

Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
 245 250 255

Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Glu Thr Val
 260 265 270

His Gly Ser Met Lys
 275



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 679442
FR 0600148

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 2004/147734 A1 (DOUCETTE-STAMM LYNN ET AL) 29 juillet 2004 (2004-07-29) * le document en entier * en particulier: * abrégé * * séquence 7284 * * séquence 3512 * * page 2, alinéa 8 * * page 2, alinéa 15 * * page 3, alinéa 23 - page 4, alinéa 30 * * page 4, alinéas 33,36,38 - page 5, alinéa 41 * * page 5, alinéa 44 - alinéa 47 * * page 14, alinéa 140 * * revendications 4,8 * -----	1-9	G01N33/569 G01N33/68 C12Q1/68 C12R1/445 C12R1/45 A61K48/00 A61K39/085 A61P31/04
X	US 5 700 928 A (HODGSON ET AL) 23 décembre 1997 (1997-12-23) * le document en entier * en particulier: * abrégé * * séquences 1-2 * * colonne 2, ligne 18 - ligne 22 * * colonne 2, ligne 32 - ligne 35 * * colonne 2, ligne 42 - ligne 44 * * colonne 2, ligne 49 - ligne 56 * * colonne 3, ligne 51 - ligne 52 * * colonne 3, ligne 59 - ligne 61 * * colonne 4, ligne 4 - ligne 7 * * colonne 12, ligne 16 - ligne 19 * * colonne 15, ligne 34 - ligne 36 * -----	1-9	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) G01N C12R
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
15 septembre 2006		Gall, Anne-Laure	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0600148 FA 679442

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **15-09-2006**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2004147734 A1	29-07-2004	AUCUN	

US 5700928 A	23-12-1997	EP 0857214 A1	12-08-1998
		WO 9714800 A1	24-04-1997
		JP 11514870 T	21-12-1999
