

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication :

3 088 652

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

②1 N° d'enregistrement national :

18 71669

⑤1 Int Cl⁸ : C 12 Q 1/04 (2019.01), C 12 M 1/12

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 21.11.18.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 22.05.20 Bulletin 20/21.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : NANOTRACKS DIAGNOSTICS
Société par actions simplifiée — FR.

⑦2 Inventeur(s) : MAS Olivier, BOULHIMEZ Karim et
CHAIBI Najim.

⑦3 Titulaire(s) : NANOTRACKS DIAGNOSTICS Société
par actions simplifiée.

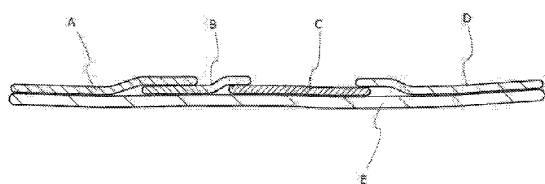
⑦4 Mandataire(s) : AQUINOV.

⑤4 Détection in vitro de la présence d'au moins un agent pathogène microbien dans un échantillon biologique.

⑤7 L'objet de l'invention est un procédé pour la détection
in vitro en moins de 15 minutes de la présence d'au moins
un agent pathogène microbien dans un échantillon biolo-
gique liquide, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en
contact ledit échantillon avec au moins un des peptides an-
timicrobiens suivants : surfactine, polymyxine B, bacitracine
A et oligoacylsine.

L'invention a également pour objet un dispositif adapté à
la mise en œuvre d'un tel procédé.

Figure pour l'abrégé : Fig. 1



FR 3 088 652 - A1



Description

Titre de l'invention : Détection in vitro de la présence d'au moins un agent pathogène microbien dans un échantillon biologique

- [0001] La présente invention concerne la détection de pathogènes microbiens dans des échantillons biologiques. L'invention vise en particulier un procédé pour la détection rapide in vitro de la présence d'au moins un agent pathogène microbien, ainsi qu'un dispositif particulièrement adapté pour la mise en œuvre de ce procédé.
- [0002] Dans de nombreux domaines, il est indispensable de réaliser des tests bactériologiques. C'est le cas notamment dans le domaine de l'analyse médicale comme par exemple dans le cadre d'une surveillance ou d'une suspicion d'un trouble biologique, d'une infection urinaire, de septicémie recherchée dans le cadre d'une hémoculture ou encore en cas de taux élevé de leucocytes lors d'analyses de sang de routine. Dans ce domaine, le diagnostic microbiologique et en particulier bactérien consiste à mettre en évidence et à identifier les bactéries lorsqu'elles sont présentes dans un liquide biologique (urine, sang, liquide céphalo rachidien, etc.).
- [0003] Plusieurs techniques sont actuellement utilisées pour la détection des agents pathogènes microbiens. Elles peuvent être regroupées en trois grandes familles :
- [0004] Les techniques de mise en culture :
- Ce sont les techniques utilisées comme gold standard en analyse microbiologique. Les échantillons sont prélevés par l'intermédiaire d'un écouvillon, puis sont mis en culture dans un milieu riche en nutriments permettant la croissance de microorganismes, puis incubés afin de déterminer la présence ou l'absence de germes microbiologiques. Cette étape est très longue, de 2 à 5 jours en moyenne, pouvant aller jusqu'à 21 jours dans le cadre de recherche de souches bactériennes particulières comme le Bacille de Koch.
- Ces délais extrêmement longs sont incompatibles avec le besoin des praticiens, biologistes et médecins, en particulier pour des cas d'urgence, une décision thérapeutique tardive pouvant avoir des conséquences très graves jusqu'au décès du patient. Ces tests sont donc essentiels et vitaux.
- De plus ces techniques nécessitent l'utilisation de matériels et instruments spécifiques comme un incubateur, des boîtes de Pétri, qui peuvent être la source de contamination croisée lors de l'essaimage.
- [0005] Les techniques immunologiques :
- Il s'agit de tests classiques en immunologie avec mise en relation d'un anticorps spécifique et d'un antigène bactérien correspondant. Après une phase d'incubation allant de 6 heures à 48 heures, les résultats apparaissent par capture avec un second

anticorps marqué à l'or colloïdale ou autres procédés de détection enzymatiques ou par fluorescence.

Bien que plus rapides que les techniques de mise en culture, le délai est encore trop long en regard du besoin. De plus, si ces tests ont une haute spécificité, leur sensibilité dépend de la concentration du liquide biologique ce qui pose des problèmes pour certaines analyses. De ce fait, la mise en œuvre de ces tests est toujours précédée d'une étape de mise en culture ce qui rallonge encore le délai d'obtention des résultats. En outre, toujours du fait de leur très haute spécificité, ces tests ne permettent pas de détecter les variants d'une même souche.

Des sociétés de biotechnologie développent actuellement des techniques de multiplexing, c'est-à-dire des tests permettant de détecter plusieurs bactéries en même temps sur des puces où sont fixés plusieurs anticorps. Toutefois, elles rencontrent des problématiques de cinétique de réaction antigène-anticorps différents. En effet, chaque réaction avec un anticorps spécifique a sa propre cinétique. Il en résulte que les bruits de fond et les signaux non spécifiques augmentent avec le nombre d'anticorps dans le multiplexe limitant ainsi le nombre de cibles pouvant être détectées.

[0006] Les techniques de biologie moléculaire.

Ces techniques utilisent la détection de séquence génétique (ARN ou ADN bactérien). La première étape est une extraction du liquide biologique à analyser qui est ensuite purifié par centrifugation et d'ultracentrifugation. La deuxième étape est l'amplification du matériel biologique par PCR (réaction en chaîne par polymérase). Le test se termine par une étape de détection et identification de la présence du matériel génétique bactérien grâce à des sondes par SPR (résonance plasmon de surface), par spectrophotométrie de masse ou par PCR en temps réel.

Ces techniques sont complexes à mettre en œuvre et nécessitent du personnel spécialisé et un équipement lourd. De plus, ces tests sont très onéreux avec un taux de faux positifs élevé car pas spécifiques mais très sensibles. Enfin, le temps de rendu des résultats en urgence est trop long, entre 7 et 8 heures en moyenne.

[0007] Face à ces constats, il existe un besoin important et urgent, pour un test diagnostic pour la détection d'agents pathogènes microbiens, palliant les inconvénients des techniques existantes. L'objectif de l'invention est de répondre à ce besoin et de proposer un procédé et un dispositif rapide, simple, économique et efficace.

[0008] A cet effet, l'invention a pour objet un procédé pour la détection in vitro en moins de 15 minutes de la présence d'au moins un agent pathogène microbien dans un échantillon biologique liquide, qui consiste à mettre en contact ledit échantillon avec au moins un des peptides antimicrobiens suivants : surfactine, polymyxine B, bacitracine A et oligoacylsine.

[0009] Ces peptides antimicrobiens sont connus mais pas utilisés dans la détection in vitro.

Avantageusement, ils permettent la détection de façon très simple et très rapide de l'ensemble des pathogènes à rechercher chez l'homme lors d'examens cyto-bactériologiques urinaires et sanguins notamment, et plus largement dans d'autres domaines comme l'industrie agro-alimentaire, l'industrie pharmaceutique ou cosmétique.

[0010] L'invention a également pour objet un dispositif adapté pour la mise en œuvre d'un tel procédé. En particulier l'invention vise un dispositif pour la détection in vitro de la présence d'au moins un agent pathogène microbien dans un échantillon biologique liquide par migration latérale.

[0011] Un tel dispositif peut être constitué par au moins quatre membranes :

- Une membrane poreuse A, destinée au dépôt de l'échantillon biologique liquide,
- Une membrane poreuse B partiellement superposée avec la membrane A, imprégnée par au moins un des peptides antimicrobiens suivants : surfactine, polymyxine B, bacitracine A et oligoacylysine, conjugué(s) à au moins une nanoparticule colorée ou produisant un signal,
- Une membrane poreuse C, partiellement superposée avec la membrane B, sur laquelle sont fixés le ou les mêmes peptides antibiotiques que sur la membrane B, et
- une membrane poreuse D, partiellement superposée avec la membrane C, destinée à récupérer les excédents des liquides biologiques appliqués sur la membrane A ayant migrés de la membrane A, dans la membrane B puis dans la membrane C.

[0012] Selon une variante, le dispositif selon l'invention est constitué par au moins deux membranes :

- une membrane C' sur laquelle sont fixés au moins un des peptides antimicrobiens suivants : surfactine, polymyxine B, bacitracine A et oligoacylysine, cette membrane étant destinée à être immergée au moins partiellement dans un mélange liquide constitué par l'échantillon biologique liquide et une solution comprenant le ou les mêmes peptides antibiotiques que sur la membrane C' conjugués à au moins une nanoparticule colorée ou produisant un signal,
- et une membrane poreuse D', partiellement superposée avec la membrane C', destinée récupérer les excédents des liquides biologiques ayant migrés dans la membrane C'.

[0013] Le dispositif selon l'invention est simple à fabriquer et à utiliser, économique et permet une détection très rapide de la présence d'agents pathogènes microbiens dans un liquide.

[0014] L'invention est à présent décrite en détails en regard des figures annexées sur lesquelles :

[0015] [fig.1] représente un exemple de mode de réalisation d'un dispositif selon l'invention,

[0016] [fig.2] représente un autre exemple de mode de réalisation d'un dispositif selon

l'invention,

- [0017] [fig.3] représente des résultats d'essais obtenus par la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention sur un dispositif selon l'invention, dont les protocoles sont présentés dans la présente demande,
- [0018] [fig.4] représente des résultats d'essais obtenus par la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention sur un dispositif selon l'invention, dont les protocoles sont présentés dans la présente demande,
- [0019] [fig.5] représente des résultats d'essais obtenus par la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention sur un dispositif selon l'invention, dont les protocoles sont présentés dans la présente demande,
- [0020] [fig.6] représente des résultats d'essais obtenus par la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention sur un dispositif selon l'invention, dont les protocoles sont présentés dans la présente demande,
- [0021] [fig.7] représente des résultats d'essais obtenus par la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention sur un dispositif selon l'invention, dont les protocoles sont présentés dans la présente demande,
- [0022] [fig.8] représente des résultats d'essais obtenus par la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention sur un dispositif selon l'invention, dont les protocoles sont présentés dans la présente demande.

Définitions

- [0023] Par « agent pathogène microbien » au sens de l'invention, on entend tout microorganisme pathogène pour l'être humain ou l'animal, en particulier des bactéries, des virus, des champignons, des parasites.
- [0024] Par « dérivé du sang » humain ou animal au sens de l'invention, on entend les préparations obtenues à partir de sang destinées à être injectées à l'être humain ou l'animal dans le cadre d'une transfusion à savoir les concentrés de globules rouges, les concentrés de plaquettes et tout concentré intermédiaire nécessaire à la préparation.
- [0025] Par « échantillon stérile » au sens de l'invention on entend un échantillon d'un élément qui, à l'état normal, ne doit pas contenir d'agent pathogène microbien.
- [0026] Par « fluide biologique humain ou animal » au sens de l'invention on entend tout fluide du corps d'un être humain ou d'un animal, en particulier le sang, le sérum et/ou plasma, le liquide céphalo rachidien, les liquides pleuraux, les liquides intra articulaires.
- [0027] Par « un peptide antimicrobien conjugué » au sens de l'invention on entend un peptide antimicrobien conjugué à au moins une nanoparticule.
- [0028] Par « peptide antimicrobien seul » au sens de l'invention on entend un peptide antimicrobien qui n'est pas conjugué à une ou plusieurs nanoparticules.

Description détaillée de l'invention

- [0029] L'invention a donc pour objet un procédé pour la détection très rapide, in vitro, de la présence d'au moins un agent pathogène microbien dans un échantillon biologique liquide.
- [0030] Par très rapide on entend une durée de détection inférieure à 15 minutes, préférentiellement inférieure à 10 minutes, encore plus préférentiellement inférieure à 5 minutes.
- [0031] L'échantillon biologique liquide peut provenir de tout élément biologique, en particulier :
- un échantillon prélevé du corps humain ou animal, préférentiellement un échantillon d'un fluide biologique humain ou animal tel que notamment un échantillon d'urine ou de sang humain ou animal ou d'un dérivé du sang (par exemple le plasma, les plaquettes, les globules rouges ou le sérum),
 - un aliment, une composition cosmétique, un complément alimentaire ou un médicament sous forme liquide, ou de l'eau,
 - un liquide dans lequel ont été extraits les éventuels agents pathogènes microbiens d'un échantillon biologique solide, tel qu'un aliment, une composition cosmétique, un complément alimentaire ou un médicament solide ; préférentiellement ce type d'échantillon biologique liquide est obtenu par dilution de l'échantillon biologique solide dans une solution tampon (comme par exemple une solution de tampon MES) puis centrifugation.
- [0032] Préférentiellement l'échantillon testé est un échantillon stérile à l'état normal, notamment un échantillon d'un liquide stérile à l'état normal présent dans le corps humain ou animal.
- [0033] L'échantillon biologique peut être traité avant de mettre en œuvre le procédé selon l'invention. En particulier il peut être déionisé de façon à améliorer le fonctionnement du procédé selon l'invention par une résine échangeur d'anion faible de chez Purolite®.
- [0034] Le procédé selon l'invention consiste à mettre en contact l'échantillon biologique liquide avec au moins un des peptides antimicrobiens suivants :
- surfactine,
 - polymixine B,
 - bacitracine A, et
 - oligoacylysine.
- [0035] Préférentiellement la procédé selon l'invention consiste à mettre en contact ledit échantillon biologique avec au moins un mélange d'au moins deux des peptides antimicrobiens suivants : surfactine, polymixine B, bacitracine A et oligoacylysine.

- [0036] L'invention peut également consister à mettre en contact ledit échantillon biologique avec au moins un mélange d'au moins trois de ces peptides antimicrobiens, et préférentiellement un mélange comprenant au moins les quatre peptides antimicrobiens suivants : surfactine, polymixine B, bacitracine A et oligoacylsine.
- [0037] La présence des quatre peptides permet avec un seul et même test de couvrir tous les agents pathogènes microbiens existants car il permet de couvrir un spectre large de reconnaissance des bactéries Gram positives et négatives. Il permet en particulier de détecter la présence d'*Escherichia coli*, de *Proteus*, de *Staphylocoque aureus*, de *Streptocoque D*.
- [0038] Si l'on utilise la polymixine B seule, qui appartient au groupe des peptides cationiques, cela permet de détecter les agents pathogènes microbiens de type bactéries Gram négatives principalement mais également certaines bactéries Gram positives telles que les *Staphylocoques* en outre mais également les *Pseudomonas*, *Escherichia coli* et *Proteus*.
- [0039] Si l'on utilise la surfactine seule cela permet de détecter les agents pathogènes microbiens de type bactéries Gram positives principalement, en particulier les *Staphylocoques*, mais également les bactéries Gram négatives par exemple *Escherichia coli*.
- [0040] Si l'on utilise la bacitracine A seule, cela permet de détecter les agents pathogènes microbiens de type bactéries Gram négatives principalement, par exemple *Escherichia coli*.
- [0041] Si l'on utilise l'oligoacylsine seule cela permet de détecter les agents pathogènes microbiens de type bactéries Gram négatives principalement, par exemple *Escherichia coli*.
- [0042] Dans le procédé selon l'invention, l'échantillon biologique n'a pas besoin d'être mis en culture préalablement à la mise en contact avec ledit au moins un peptide antimicrobien. En effet de manière surprenante, les peptides antimicrobiens sélectionnés spécifiquement selon l'invention ont une affinité forte avec les agents pathogènes microbiens, et présentent une action qui se décompose en deux temps :
- dans un premier temps, la fixation des peptides avec les agents pathogènes microbiens par un rapprochement par opposition de charge sur la membrane bactérienne, et
 - dans un second temps la fixation dans la membrane des agents pathogènes microbiens par ancrage aux lipides polysaccharidiques composant la membrane des bactéries Gram négatives.
- [0043] Les éventuels agents pathogènes microbiens présents dans l'échantillon biologique liquide mis en contact avec le ou les peptides antimicrobiens, se fixent sur lesdits peptides antimicrobiens et forment un complexe qu'il est possible de détecter et qui confirme la présence desdits agents pathogènes microbiens dans l'échantillon

biologique liquide.

- [0044] Pour faciliter la détection de la présence des agents pathogènes microbiens, au moins une partie des peptides antimicrobiens utilisés, préférentiellement tous, sont conjugués avec au moins un marqueur, préférentiellement avec une nanoparticule colorée ou produisant un signal. Il peut s'agir de façon préférée de billes colorées, ou magnétiques, ou par fluorescence préférentiellement d'une taille moyenne comprise entre 1µm et 200µm, telles que par exemple des nanoparticules d'or, de polystyrène, en latex ou magnétiques. Il peut donc s'agir de billes d'or, de billes de polystyrène, de billes magnétiques.
- [0045] La liaison entre les peptides antimicrobiens et les nanoparticules colorées ou produisant un signal peut être réalisée de manière covalente ou non covalente avec ou sans spacer et/ou linker. Pour les nanoparticules d'or par exemple, il peut s'agir d'une liaison streptavidine biotine (les peptides sont biotynilés et les nanoparticules d'or sont sensibilisées à la streptavidine), ou par liaison de Van Der Waals, liaisons hydrophobes ou opposition de charge.
- [0046] Le procédé selon l'invention permet ainsi de visualiser très facilement la présence ou non d'agents pathogènes microbiens dans l'échantillon testé notamment visuellement ou par détection de fluorescence ou par détection magnétique, les agents pathogènes microbiens se fixant aux peptides antimicrobiens conjugués avec des nanoparticules colorées ou produisant un signal. Préférentiellement les agents pathogènes microbiens fixés à un ou plusieurs peptides antimicrobiens conjugués migrent sur une membrane poreuse sur laquelle sont fixés le ou les même(s) peptides antimicrobiens seuls. Il suffit ensuite de visualiser la présence ou non de couleur ou d'un signal sur ladite membrane au niveau de la zone de fixation des peptides antimicrobiens seuls, pour savoir si des agents pathogènes microbiens sont présents.
- [0047] Pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention, pour obtenir un signal positif en cas de présence d'agents pathogènes microbiens dans l'échantillon biologique testé, il est préféré d'utiliser une concentration minimale de peptides antimicrobien comprise entre 0,05µg et 1000 µg par ml d'échantillon biologique liquide testé.
- [0048] Le procédé selon l'invention peut-être mis en œuvre sur tout type de dispositif adapté, notamment par migration latérale ou verticale.
- [0049] Préférentiellement, le procédé selon l'invention est mis en œuvre sur un dispositif particulier qui fait également l'objet de l'invention.
- [0050] Selon une première variante, dont un exemple est représenté sur la Figure 1, ce dispositif est un dispositif pour la détection in vitro de la présence d'au moins un agent pathogène microbien dans un échantillon biologique liquide par migration latérale constitué par au moins quatre membranes :
- Une membrane poreuse A, destinée au dépôt de l'échantillon biologique liquide,

préférentiellement une membrane en cellulose, pour permettre le recueil de l'échantillon biologique,

- Une membrane poreuse B partiellement superposée avec la membrane A, imprégnée par au moins un des peptides antimicrobiens suivants : surfactine, polymyxine B, bacitracine A et oligoacylsine, conjugué(s) à au moins une nanoparticule colorée ou produisant un signal ; la membrane B doit permettre un relargage et une migration latérale fluide ; pour ce faire elle est préférentiellement en fibre de verre.
- Une membrane poreuse C, partiellement superposée avec la membrane B, sur laquelle sont fixés le ou les mêmes peptides antimicrobiens que sur la membrane B ; la membrane C est préférentiellement en nitrocellulose ce qui permet une plus grande sensibilité que d'autres types de membranes, ainsi qu'une migration fluide et une meilleure accroche des peptides anti microbiens coatés sur la membrane ; la membrane C est appelée membrane de révélation ; et
- Une membrane poreuse D, partiellement superposée avec la membrane C, destinée à récupérer les excédents des liquides biologiques appliqués sur la membrane A ayant migrés de la membrane A, dans la membrane B puis dans la membrane C ; la membrane D doit permettre une absorption des excès de fluides biologiques ; pour ce faire elle est préférentiellement en coton et/ou cellulose.

[0051] Les membranes sont poreuses. Les diamètres des pores des membranes A, B, C et D sont compris entre 1 et 200 μm , de façon à ce que l'échantillon biologique puisse migrer latéralement et d'une membrane à l'autre.

[0052] Les membranes sont partiellement superposées successivement, au-dessus ou en-dessous, de façon à ce que le liquide migre par capillarité dans la membrane suivante et continue ensuite sa migration latérale. De façon préférée, tel que présenté sur la Figure 1, la membrane B est partiellement sous la membrane A, la membrane C est partiellement sous la membrane B, et la membrane D est partiellement sur la membrane C. Cette disposition est en particulier adaptée à l'utilisation d'une membrane C en nitro-cellulose imperméable dessous.

[0053] De plus, il est préféré que les membranes soient maintenues au moins partiellement les unes avec les autres, au niveau des zones de superposition, par un adhésif F, qui permet de maintenir entre elles les membranes plaquées. Il peut s'agir en particulier d'une bande adhésive.

[0054] Préférentiellement, le dispositif comprend sous les membranes A, B, C et D, une membrane (ou support) E rigide de soutien et adhésive qui permet de soutenir et fixer les membranes A, B, C et D.

[0055] Le dispositif peut être recouvert par un couvercle sur les membranes, avec deux fenêtres, une fenêtre de dépôt de l'échantillon biologique liquide et une fenêtre de lecture du résultat du test : une au niveau de la zone de dépôt sur la membrane A pour

le dépôt, et une au niveau de la zone de lecture sur la membrane C.

[0056] La membrane C peut également comprendre un contrôle positif, en particulier une ligne témoin qui permet de vérifier que le test a fonctionné. Ce contrôle positif peut être constitué par un dépôt de BSA (Bovine Serum Albumin) biotynilé.

[0057] La fixation des conjugués peptides antimicrobiens conjugués aux nanoparticules colorées ou produisant un signal sur la membrane C est préférentiellement réalisée par fixation EDC-NHS.

[0058] Avec un tel dispositif le procédé selon l'invention consiste donc à déposer l'échantillon biologique liquide dont on souhaite savoir s'il contient ou non un agent pathogène microbien, au niveau de la membrane A et à observer la présence ou non d'un signal au niveau de la membrane C. En particulier le procédé peut être décomposé comme suit :

- dépôt de l'échantillon biologique liquide dont on souhaite savoir s'il contient ou non un agent pathogène microbien sur la membrane A,
- migration de l'échantillon biologique liquide sur la membrane B,
- complexation sur la membrane B du ou des éventuel(s) agent(s) pathogène(s) microbien(s) présent(s) dans l'échantillon biologique sur le ou les peptide(s) anti-microbien(s) conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal, et migration sur la membrane C du liquide contenant le ou lesdits complexe(s) agent(s) microbien(s) - peptide(s) antimicrobiens conjugués à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal,
- fixation sur la membrane C du ou des complexe(s) agent(s) pathogène(s) microbien(s) - peptide(s) antimicrobiens conjugués à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal, sur le ou les peptides antimicrobiens présents sur la membrane C,
- migration de l'excédent éventuel de liquide de la membrane C sur la membrane D.

[0059] Si des agents pathogènes microbiens sont présents dans l'échantillon biologique, une coloration ou un signal apparaîtra sur la membrane C.

[0060] Sinon aucun agent pathogène microbien n'est présent dans l'échantillon biologique, aucune coloration ou aucun signal n'apparaîtra sur la membrane C, à l'exception du contrôle positif si le dispositif comporte un contrôle positif.

[0061] Selon une deuxième variante, dont un exemple est représenté sur la Figure 2, ce dispositif est un dispositif pour la détection in vitro de la présence d'au moins un agent pathogène microbien dans un échantillon biologique liquide par migration latérale constitué par au moins deux membranes :

- une membrane C' sur laquelle est fixé au moins un des peptides antimicrobiens suivants : surfactine, polymyxine B, bacitracine A et oligoacylsine, cette membrane étant destinée à être immergée au moins partiellement dans un mélange liquide

constitué par l'échantillon biologique liquide à tester et une solution comprenant le ou les mêmes peptides antimicrobiens que ceux fixés sur la membrane C', ces peptides antimicrobiens présents dans le mélange liquide étant conjugués à au moins une nanoparticule colorée ou produisant un signal,

- et une membrane poreuse D', partiellement superposée avec la membrane C', destinée à récupérer les excédents des liquides biologiques ayant migrés dans la membrane C'.

[0062] Les membranes sont poreuses. Les diamètres des pores des membranes C' et D' sont compris entre 1 et 200 μm , de façon à ce que l'échantillon biologique puisse migrer latéralement.

[0063] Préférentiellement, le dispositif comprend sous les membranes C' et D', une membrane (ou support) E' rigide de soutien et adhésive qui permet de soutenir et fixer les membranes C' et D'.

[0064] Comme la membrane C, la membrane C' peut également comprendre un contrôle positif, en particulier une ligne témoin qui permet de vérifier que le test a fonctionné.

[0065] Avec un tel dispositif le procédé selon l'invention consiste donc à immerger partiellement la membrane C' du dispositif dans un mélange liquide constitué par l'échantillon biologique liquide dont on souhaite savoir s'il contient ou non un agent pathogène microbien, et une solution comprenant un ou des peptides antimicrobiens conjugués, ce ou ces peptides étant les mêmes que ceux fixés sur la membrane C'. On observe ensuite la présence ou non d'un signal au niveau de la membrane C'.

[0066] En particulier le procédé peut être décomposé comme suit :

- dépôt dans un contenant, par exemple un puits ou un micro-puits :

* de l'échantillon biologique liquide dont on souhaite savoir s'il contient ou non un agent pathogène microbien, et

* d'une solution comprenant le ou les mêmes peptide(s) antimicrobien(s) que ceux fixé(s) sur la membrane C', conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal,

- complexation du ou des éventuel(s) agent(s) pathogène(s) microbien(s) présent(s) dans l'échantillon biologique sur le ou les peptide(s) antimicrobien(s) conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal,

- immersion partielle de la membrane C' dans le mélange liquide constitué par l'échantillon biologique et la solution de peptide(s) antimicrobien(s) conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal,

- migration sur la membrane C' dudit mélange,

- fixation sur la membrane C' du ou des complexe(s) agent(s) microbien(s) - peptide(s) antimicrobiens conjugués à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal, sur le ou les peptides antimicrobiens présents sur la membrane C',

- migration de l'excédent éventuel de liquide de la membrane C' sur la membrane D'.
- [0067] Si des agents pathogènes microbiens sont présents dans l'échantillon biologique, une coloration ou un signal apparaîtra sur la membrane C'.
- [0068] Sinon aucun agent pathogène microbien n'est présent dans l'échantillon biologique, aucune coloration ou aucun signal n'apparaîtra sur la membrane C', à l'exception du contrôle positif si le dispositif comporte un contrôle positif.
- [0069] Cette mise en œuvre est notamment adaptée lorsque les peptides antimicrobiens sont conjugués à des nanoparticules de polystyrène.
- [0070] Selon une variante, le procédé peut également être décomposé comme suit :
- dépôt dans un contenant, par exemple un puits ou un micro-puits, de l'échantillon biologique liquide dont on souhaite savoir s'il contient ou non un agent pathogène microbien,
 - dépôt dans un autre contenant, par exemple un puits ou un micro-puits, d'une solution comprenant le ou les mêmes peptide(s) antimicrobien(s) que ceux fixé(s) sur la membrane C', conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal,
 - immersion partielle de la membrane C' dans l'échantillon biologique à tester, et migration de l'échantillon biologique sur la membrane C',
 - immersion partielle de la membrane C' dans la solution de peptide(s) anti-microbien(s) conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal, et migration de l'échantillon biologique sur la membrane C',
 - complexation du ou des éventuel(s) agent(s) pathogène(s) microbien(s) présent(s) dans l'échantillon biologique sur le ou les peptide(s) antimicrobien(s) conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal,
 - fixation sur la membrane C' du ou des complexe(s) agent(s) microbien(s) - peptide(s) antimicrobiens conjugués à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal, sur le ou les peptides antimicrobiens présents sur la membrane C',
 - migration de l'excédent éventuel de liquide de la membrane C' sur la membrane D'.
- [0071] Si des agents pathogènes microbiens sont présents dans l'échantillon biologique, une coloration ou un signal apparaîtra sur la membrane C'.
- [0072] Sinon aucun agent pathogène microbien n'est présent dans l'échantillon biologique, aucune coloration ou aucun signal n'apparaîtra sur la membrane C', à l'exception du contrôle positif si le dispositif comporte un contrôle positif.
- [0073] Cette mise en œuvre est notamment adaptée lorsque les peptides antimicrobiens sont conjugués à des nanoparticules d'or.
- [0074] L'invention est à présent illustrée par des exemples de dispositifs et de procédé selon l'invention, et des résultats d'essais.

Exemples

[0075] Exemple 1 : Dispositif selon l'invention variante C' / D' / E' - conjugué billes d'or(nanoparticules d'or)

[0076] Préparation d'une solution de coating :

Préparer du HCl 1M en ajoutant HCl et eau purifiée.

Préparer du Tris 10mM en ajoutant Tris et eau purifiée, puis agiter jusqu'à dissolution complète et ajuster le pH à 9 avec du HCl 1M.

Dans un microtube, ajouter le tampon Tris 10mM à pH ajusté et du PMB (Polymyxine B) 20g/L et agiter (concentration finale 1g/L).

[0077] Préparation des bandelettes test :

A partir d'un rouleau de membrane nitrocellulose (C'), découper des bandes. Coater les bandes avec la solution de coating préparée précédemment à l'aide d'un disperseur à débit constant continu.

Laisser sécher les membranes 24h à 72h.

Découper des backing card (E').

Découper des membranes en cellulose (D').

Disposer sur une backing card les membranes nitrocellulose (C') et cellulose (D') en faisant un chevauchement de la membrane cellulose (D') sur la membrane nitro-cellulose (C').

Afin de permettre un bon contact entre les membranes (et donc une bonne migration), coller les membranes à l'aide de scotch provenant de la société Kenosha en superposition sur les membranes.

[0078] Préparation d'un tampon TP2-Tris :

Préparer un TBS 50mM ans en mélangeant du Tris, du NaCl et de l'eau purifiée.

Agiter jusqu'à dissolution complète puis ajuster le pH à 7 avec du HCl 1M.

Dans un tube ajouter du TBS 50mM avec du BSA, du sucrose et du Tween 20.

Agiter jusqu'à dissolution complète

[0079] Préparation d'un conjugué billes d'or (nanoparticules d'or)

Dans un microtube, ajouter du Gold citrate et centrifuger. Enlever le surnageant et remettre le culot en suspension dans le TP2-Tris obtenu précédemment. Mettre la solution Gold en stabilisation minimum au réfrigérateur.

Dans un microtube, mélanger du PMB (polymyxine B) et TP2-Tris au vortex (concentration finale 1g/L).

Ajouter de la PMB 1g/L à la solution de Gold en TP2-Tris, agiter doucement au vortex.

Diluer le conjugué au 1/3 avec du TP2-Tris avant utilisation.

[0080] Exemple 2 : Dispositif selon l'invention variante C' / D' / E' – conjugué billes de

PS-COOH (nanoparticules de polystyrene)

- [0081] Préparation d'une solution de coating et de bandelettes test comme dans l'exemple 1.
- [0082] Réalisation d'un tampon TPS-MES :
 Préparer une solution de MES en ajoutant du MES et de l'eau purifiée.
 Agiter jusqu'à dissolution complète puis ajuster le pH à 5 avec du HCl 1M.
 Dans un tube ajouter la solution de MES, du BSA, du sucre et du Tween 20.
 Agiter jusqu'à dissolution complète.
- [0083] Préparation d'un conjugué PS-COOH
 Dans un microtube, déposer du TP2-MES et des billes PS-COOH. Ajouter de l'EDC et du NHS et les ajouter simultanément à la solution de billes de PS-COOH 1%.
 Bien agiter par vortex et flush.
 Ajouter du PMB 20g/L, et agiter doucement au vortex.
 Centrifuger et enlever le surnageant et remettre les culots en suspension dans du TP2-MES.
- [0084] **Exemple 3 : Dispositif selon l'invention variante A/B/C/ D/E – conjugué billes d'or**
- [0085] Préparation d'une solution de coating :
 La même solution de coating que pour l'exemple 1 est réalisée.
- [0086] Préparation des bandelettes test :
 A partir d'un rouleau de membrane nitrocellulose (C), découper des bandes. Coater les bandes avec la solution de coating préparée précédemment à l'aide d'un dispenser provenant de la société Clarmontbio Solutions à débit constant et continu.
 Laisser sécher les membranes 24h à 72h.
 Découper des backing card (E).
 Découper des membranes en cellulose (A, D).
 Découper des membranes en fibre de verre (B).
 Disposer sur une backing card les membranes fibre de verre (B), nitrocellulose (C) et cellulose (A, D) en faisant un chevauchement de la membrane cellulose (A) sur la membrane fibre de verre (B), de la membrane fibre de verre (B) sur la membrane nitrocellulose (C) et de la membrane cellulose (D) sur la membrane nitrocellulose (C).
 Afin de permettre un bon contact entre les membranes (et donc une bonne migration), coller les membranes à l'aide de scotch Kenosha à cheval sur les membranes.
- [0087] Préparation d'un tampon TP2-Tris :
 Comme à l'exemple 1.
- [0088] Préparation d'un conjugué billes d'or (nanoparticules d'or)
 Comme à l'exemple 1.
- [0089] **Exemple 4 : Dispositif selon l'invention variante A/B/C/ D/E – conjugué billes de**

PS-COOH (nanoparticules de polystyrene)

[0090] Préparation de solutions de coating et de bandelettes test comme dans l'exemple 3.

[0091] Réalisation d'un tampon TPS-MES :

Comme à l'exemple 2.

[0092] Préparation d'un conjugué PS-COOH

Comme à l'exemple 2.

[0093] **Essais démontrant l'efficacité du procédé et des dispositifs selon l'invention**

[0094] **Préparation des échantillons**

Les échantillons sont obtenus à partir de cultures d'ECBU positifs issus d'un laboratoire d'analyses biologiques médicales.

Ces cultures ont été remises en suspension, puis congelées en glycérol 30% pour conservation, puis repiquées sur géloses Mueller-Hinton.

L'échantillon urinaire à tester est pré-traité par déionisation avec une résine échangeuse d'anions faibles.

[0095] 1ère variante : Mise en contact de l'échantillon avec une solution de nanoparticules conjugués.

Dans un puit de microplaque, déposer 100 µL d'échantillon ayant subi une déionisation. Dans un autre puit, déposer 50µL de conjugué de l'exemple 1, autant de fois qu'il y a d'échantillons (positifs ou négatifs).

Placer une bandelette test dans l'échantillon et laisser migrer jusqu'à passage des 100µL. Puis sortir la bandelette, la placer immédiatement dans le conjugué et laisser migrer jusqu'à passage des 50µL.

[0096] 2ème variante : Mise en contact de l'échantillon avec une solution de conjugués de billes de PS-COOH

Dans un puit de microplaque, déposer 25 µL d'échantillon ayant subi une déionisation et 75 µl d'une solution tampon base MES à pH 3,3. Ajouter 25µL de conjugué, autant de fois qu'il y a d'échantillons (positifs ou négatifs).

Placer une bandelette test dans le mix et laisser migrer jusqu'à passage des 125µL.

[0097] 3ème variante : dépôt d'un échantillon sur membrane coatée avec des nanoparticules d'or.

Déposer 150 µl d'échantillon sur la membrane B du dispositif de l'exemple 3 et laisser migrer.

[0098] 4ème variante : dépôt d'un échantillon sur membrane coatée avec des nanoparticules de PS-COOH.

Déposer 125 µl d'échantillon sur la membrane B du dispositif de l'exemple 4 et laisser migrer.

[0099] **Exemples de résultats obtenus avec la première (Gold-PMB) et la deuxième variante (PS-PMB)**

- [0100] Plusieurs exemples d'essais avec des échantillons contaminés versus contrôle négatif avec un échantillon non contaminé sont présentés sur les Figures 3 à 8.
- [0101] Figure 3 :
 E coli à 1CFU/mL
 Suspension en eau
 Conjugué PS-PMB 0,5µm
 On constate un signal positif pour l'échantillon d'eau contaminée et aucun signal pour l'échantillon d'eau non contaminée.
- [0102] Figure 4 :
 E coli à 1CFU/mL
 Suspension en urine déionisée
 Conjugué PS-PMB 0,5µm
 On constate un signal positif pour l'échantillon d'urine contaminée et aucun signal pour l'échantillon d'urine non contaminée.
- [0103] Figure 5 :
 E coli dilution 1/100 de la suspension à 1CFU/mL puis dilutions de ce 1/100
 Suspension en eau
 Conjugué PS-PMB 0,5µm
 On constate des résultats positifs pour les échantillons contaminés jusqu'à 1/400. Le dernier signal visible correspond en effet à la dilution 1/400 de la suspension initiale à 1CFU/mL. Après mise en culture, ce signal visible correspond à 240.000 bactéries par mL, ce qui montre une très grande sensibilité du procédé selon l'invention
 On ne constate aucun signal pour l'échantillon d'eau non contaminée. Il en est de même pour l'échantillon dilué au 1/500.
- [0104] Figure 6 :
 E coli à 1CFU/mL – différentes souches d'E coli ont été testées
 Suspension en eau
 Conjugué Gold-PMB 40nm
 On constate des résultats positifs pour tous les échantillons contaminés, quelle que soit la souche d'E coli.
 On ne constate aucun signal pour l'échantillon d'eau non contaminée
- [0105] Figure 7 :
 S.aureus à 1CFU/mL
 Suspension en eau
 Conjugué PS-PMB 0,5µm
 On constate un signal positif pour l'échantillon d'eau contaminée et aucun signal pour l'échantillon d'eau non contaminée.
- [0106] Figure 8 :

Différentes souches bactériennes (souches 1 à 4 : souches d'E. faecalis ; souches 5 et 6 : souches de S. aureus)

Suspension en TP2-Tris

Conjugué Gold-PMB 40nm

On constate des résultats positifs pour tous les échantillons contaminés, quelle que soit la souche.

On ne constate aucun signal pour l'échantillon d'eau non contaminée

Revendications

- [Revendication 1] Procédé pour la détection in vitro en moins de 15 minutes de la présence d'au moins un agent pathogène microbien dans un échantillon biologique liquide, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact ledit échantillon avec au moins un des peptides antimicrobiens suivants : surfactine, polymixine B, bacitracine A et oligoacylysine.
- [Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'échantillon est pretaité par déionisation.
- [Revendication 3] Procédé selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que ledit échantillon biologique n'est pas mis en culture préalablement à la mise en contact avec ledit au moins un peptide antimicrobien.
- [Revendication 4] Procédé selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact ledit échantillon biologique avec au moins avec un mélange d'au moins deux des peptides antimicrobiens suivants : surfactine, polymixine B, bacitracine A et oligoacylysine.
- [Revendication 5] Procédé selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact ledit échantillon biologique avec au moins avec un mélange de peptides antimicrobiens comprenant au moins les quatre peptides antimicrobiens suivants : surfactine, polymixine B, bacitracine A et oligoacylysine.
- [Revendication 6] Procédé selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que l'échantillon biologique liquide est un échantillon de fluide biologique humain ou animal.
- [Revendication 7] Procédé selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que l'échantillon biologique liquide est un échantillon d'un liquide qui à l'état physiologique normal est stérile.
- [Revendication 8] Procédé selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que l'échantillon biologique liquide est un échantillon d'urine ou de sang humain ou animal ou d'un dérivé du sang.
- [Revendication 9] Procédé selon la précédente revendication, caractérisé en ce que l'échantillon biologique liquide est un échantillon d'un dérivé du sang choisi parmi le plasma, les plaquettes, les globules rouges ou le sérum.
- [Revendication 10] Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'échantillon biologique liquide, est un aliment, une composition cosmétique, un complément alimentaire ou un médicament sous forme liquide, ou de l'eau.

- [Revendication 11] Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'échantillon biologique liquide, est un liquide dans lequel ont été extraits les éventuels agents pathogènes microbiens d'un échantillon biologique solide.
- [Revendication 12] Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'échantillon biologique solide est un échantillon d'aliment, de composition cosmétique, de complément alimentaire ou de médicament solide.
- [Revendication 13] Procédé selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'au moins une partie des peptides antimicrobiens utilisés est conjugué avec au moins une nanoparticule colorée ou produisant un signal.
- [Revendication 14] Procédé selon la précédente revendication, caractérisé en ce que la ou les nanoparticules colorées ou produisant un signal sont choisies parmi les billes colorées, fluorescentes et/ou magnétiques.
- [Revendication 15] Procédé selon la précédente revendication, caractérisé en ce que la ou les nanoparticules produisant un signal sont choisies parmi les billes colorées d'une taille moyenne comprise entre 1µm et 200µm.
- [Revendication 16] Procédé selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que la ou les nanoparticules produisant un signal sont choisies parmi des nanoparticules d'or, de polystyrène, de nanoshell, en latex ou magnétiques.
- [Revendication 17] Dispositif pour la détection in vitro de la présence d'au moins un agent pathogène microbien dans un échantillon biologique liquide par migration latérale, adapté à la mise en œuvre d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 16, constitué par au moins quatre membranes :
- Une membrane poreuse A, destinée au dépôt de l'échantillon biologique liquide,
 - Une membrane poreuse B partiellement superposée avec la membrane A, imprégnée par au moins un des peptides antimicrobiens suivants : surfactine, polymyxine B, bacitracine A et oligoacylsine, conjugué(s) à au moins une nanoparticule colorée ou produisant un signal,
 - Une membrane poreuse C, partiellement superposée avec la membrane B, au niveau de laquelle sont fixés le ou les mêmes peptides antimicrobiens que sur la membrane B, et
 - Une membrane poreuse D, partiellement superposée avec la membrane C, destinée à récupérer les excédents des liquides biologiques appliqués sur la membrane A ayant migrés de la membrane A, dans la membrane B puis dans la membrane C.
- [Revendication 18] Dispositif selon la revendication 17, caractérisé en ce que les membranes A et D sont en coton ou en cellulose et/ou que la membrane

- B est en fibre de verre et/ou que la membrane C est en nitrocellulose.
- [Revendication 19] Dispositif selon l'une des revendications 17 ou 18, caractérisé en ce que les diamètres des pores des membranes A, B, C et D sont compris entre 1 et 200 μm .
- [Revendication 20] Dispositif selon l'une des revendications 17 à 19, caractérisé en ce qu'il comprend sous les membranes A, B, C et D, une membrane E rigide de soutien et adhésive qui permet de les soutenir et les fixer.
- [Revendication 21] Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il consiste à déposer l'échantillon biologique liquide dont on souhaite savoir s'il contient ou non un agent pathogène microbien, au niveau de la membrane A d'un dispositif selon l'une des revendications 17 à 20, et à observer la présence ou non d'un signal au niveau de la membrane C.
- [Revendication 22] Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :
- dépôt de l'échantillon biologique liquide dont on souhaite savoir s'il contient ou non un agent pathogène microbien sur la membrane A,
 - migration de l'échantillon biologique liquide sur la membrane B,
 - complexation sur la membrane B du ou des éventuel(s) agent(s) pathogène(s) microbien(s) présent(s) dans l'échantillon biologique sur le ou les peptide(s) antimicrobien(s) conjugué(s) à une ou des nano-particule(s) colorée(s) ou émettant un signal, et migration sur la membrane C du liquide contenant le ou lesdits complexe(s) agent(s) microbien(s) - peptide(s) antimicrobiens conjugués à une ou des nano-particule(s) colorée(s) ou émettant un signal,
 - fixation sur la membrane C du ou des complexe(s) agent(s) microbien(s) - peptide(s) antimicrobiens conjugués à une ou des nano-particule(s) colorée(s) ou émettant un signal, sur le ou les peptides antimicrobiens présents sur la membrane C,
 - migration de l'excédent éventuel de liquide de la membrane C sur la membrane D.
- [Revendication 23] Dispositif pour la détection in vitro de la présence d'au moins un agent pathogène microbien dans un échantillon biologique liquide par migration latérale, adapté à la mise en œuvre d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 16, constitué par au moins deux membranes :
- une membrane C' sur laquelle est fixé au moins un des peptides antimicrobiens suivants : surfactine, polymyxine B, bacitracine A et oligoacylysine, cette membrane étant destinée à être immergée au moins partiellement :

- * dans l'échantillon biologique liquide à tester et dans une solution comprenant le ou les mêmes peptides antimicrobiens que ceux fixés sur la membrane C', ces peptides antimicrobiens étant conjugués à au moins une nanoparticule colorée ou produisant un signal, ou

- * dans un mélange dudit échantillon liquide et de ladite solution de peptides antimicrobiens,

- et une membrane poreuse D', partiellement superposée avec la membrane C', destinée à récupérer les excédents des liquides biologiques ayant migrés dans la membrane C'.

[Revendication 24] Dispositif selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il comprend sous les membranes C' et D', une membrane E' rigide de soutien et adhésive qui permet de les soutenir et les fixer.

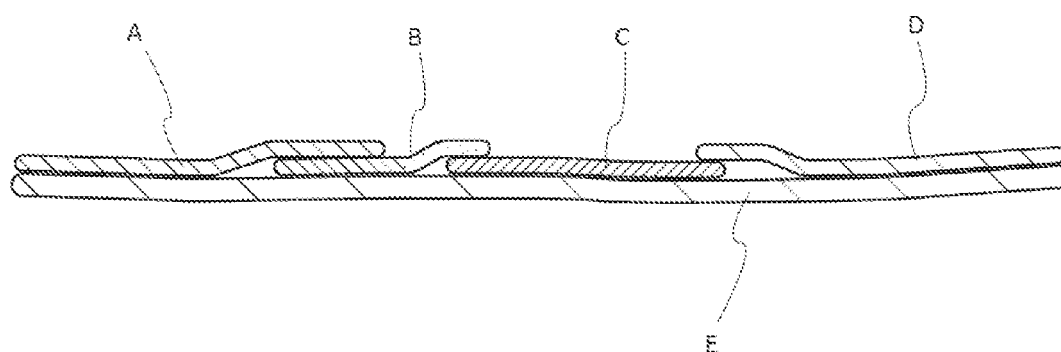
[Revendication 25] Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

- dépôt dans un contenant, par exemple un puits ou un micro-puits :
 - * de l'échantillon biologique liquide dont on souhaite savoir s'il contient ou non un agent pathogène microbien, et
 - * d'une solution comprenant le ou les mêmes peptide(s) anti-microbien(s) que ceux fixé(s) sur la membrane C', conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal,
- complexation du ou des éventuel(s) agent(s) pathogène(s) microbien(s) présent(s) dans l'échantillon biologique sur le ou les peptide(s) anti-microbien(s) conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal,
- immersion partielle de la membrane C' d'un dispositif selon l'une des revendications 23 ou 24, dans le mélange liquide constitué par l'échantillon biologique et la solution de peptide(s) antimicrobien(s) conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal,
- migration sur la membrane C' dudit mélange,
- fixation sur la membrane C' du ou des complexe(s) agent(s) microbien(s) - peptide(s) antimicrobiens conjugués à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal, sur le ou les peptides anti-microbiens présents sur la membrane C',
- migration de l'excédent éventuel de liquide de la membrane C' sur la membrane D'.

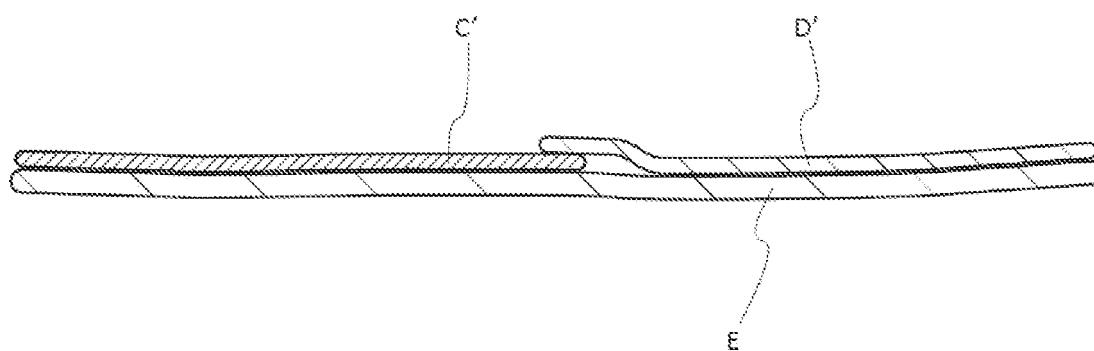
[Revendication 26] Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

- dépôt dans un contenant, par exemple un puits ou un micro-puits, de l'échantillon biologique liquide dont on souhaite savoir s'il contient ou non un agent pathogène microbien,
- dépôt dans un autre contenant, par exemple un puits ou un micro-puits, d'une solution comprenant le ou les mêmes peptide(s) antimicrobien(s) que ceux fixé(s) sur la membrane C', conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal,
- immersion partielle de la membrane C' d'un dispositif selon l'une des revendications 23 ou 24 dans l'échantillon biologique à tester, et migration de l'échantillon biologique sur la membrane C',
- immersion partielle de la membrane C' dans la solution de peptide(s) antimicrobien(s) conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal, et migration de l'échantillon biologique sur la membrane C',
- complexation du ou des éventuel(s) agent(s) pathogène(s) microbien(s) présent(s) dans l'échantillon biologique sur le ou les peptide(s) antimicrobien(s) conjugué(s) à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal,
- fixation sur la membrane C' du ou des complexe(s) agent(s) microbien(s) - peptide(s) antimicrobiens conjugués à une ou des nanoparticule(s) colorée(s) ou émettant un signal, sur le ou les peptides antimicrobiens présents sur la membrane C',
- migration de l'excédent éventuel de liquide de la membrane C' sur la membrane D'.

[Fig. 1]

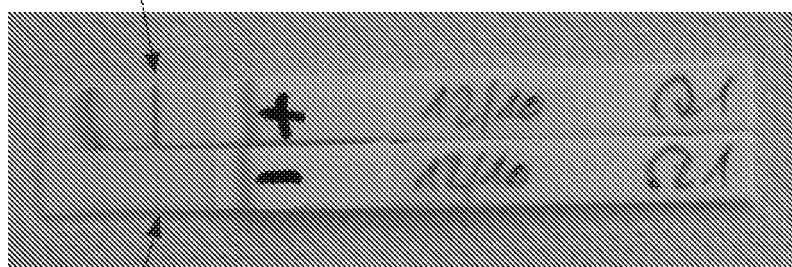


[Fig. 2]



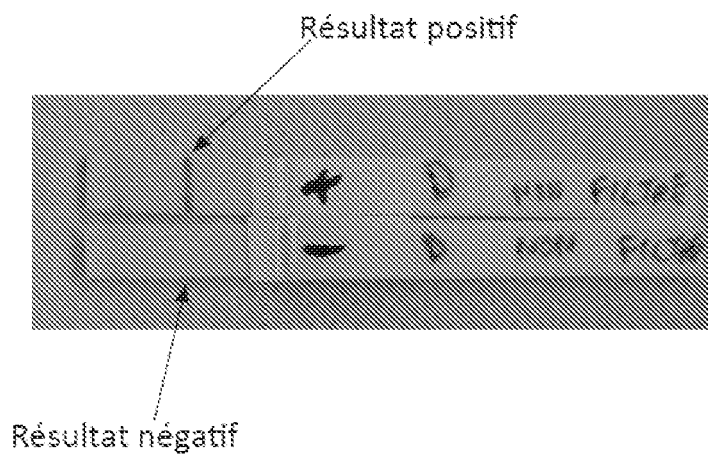
[Fig. 3]

Résultat positif

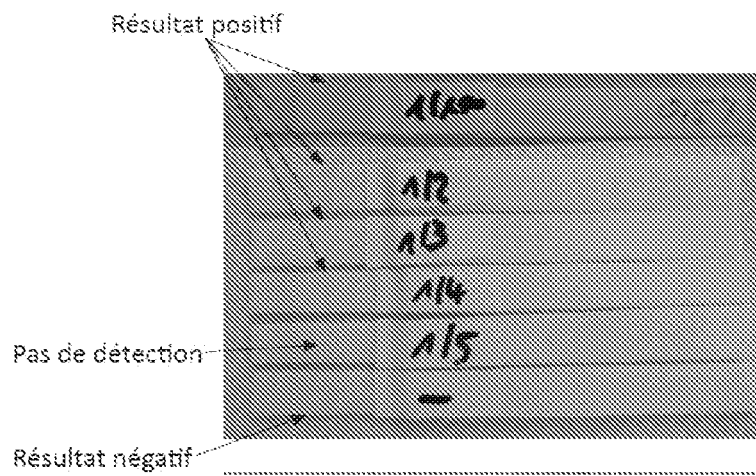


Résultat négatif

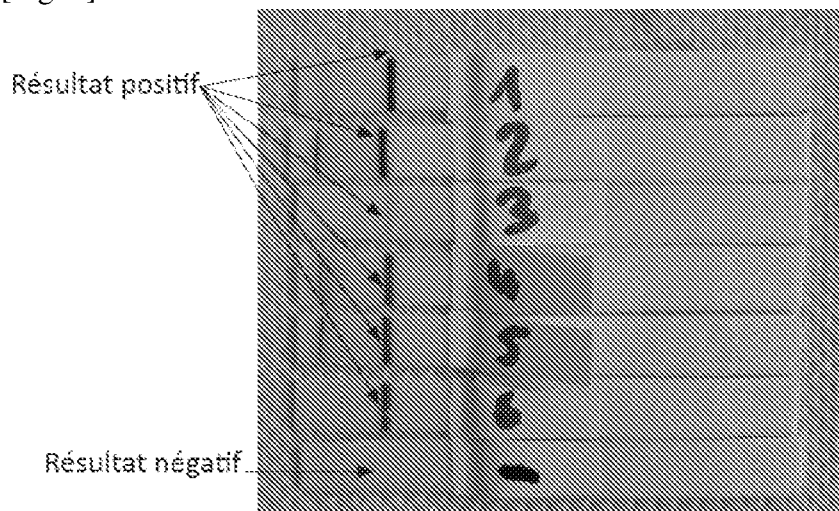
[Fig. 4]



[Fig. 5]

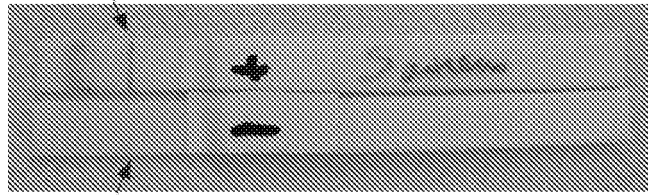


[Fig. 6]



[Fig. 7]

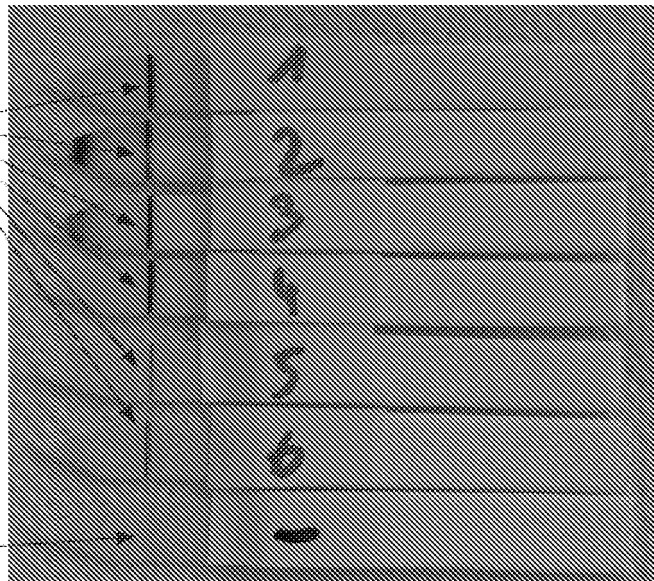
Résultat positif



Résultat négatif

[Fig. 8]

Résultat positif



Résultat négatif

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 862162
FR 1871669

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	WO 2016/024278 A1 (MEMED DIAGNOSTICS LTD [IL]) 18 février 2016 (2016-02-18) * le document en entier * * abrégé * * page 43, ligne 1 - ligne 27 * -----	17-26	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Y	WO 2016/075483 A1 (UNIV EDINBURGH [GB]) 19 mai 2016 (2016-05-19) * le document en entier * * abrégé * * page 9, ligne 18 - ligne 28 * * page 18, ligne 13 - ligne 24 * * revendications 1-8 * * revendications 9, 12, 46 * -----	17-26	
Y	WO 01/27628 A1 (OLSTEIN ALAN D [US]) 19 avril 2001 (2001-04-19) * le document en entier * * abrégé * * page 13, ligne 12 - ligne 19 * * figure 5; exemple 10 * * figure 6; exemple 11 * * revendications 1-6, 15-18 * * revendication 25 * -----	17-26	
Y	WO 2017/127684 A1 (SELUX DIAGNOSTICS INC [US]) 27 juillet 2017 (2017-07-27) * le document en entier * * abrégé * * exemple 11 * -----	17-26	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 septembre 2019		Gall-Truchot, A	
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 1871669 FA 862162**

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 **17-09-2019**
 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 6184027	B1	06-02-2001	AU 6940198 A	20-10-1998
			CA 2285675 A1	01-10-1998
			EP 0980439 A1	23-02-2000
			JP 2002503093 A	29-01-2002
			US 5935804 A	10-08-1999
			US 6090573 A	18-07-2000
			US 6159719 A	12-12-2000
			US 6184027 B1	06-02-2001
			WO 9842864 A1	01-10-1998

WO 2014093031	A1	19-06-2014	US 2015306238 A1	29-10-2015
			WO 2014093031 A1	19-06-2014

WO 2016024278	A1	18-02-2016	AU 2015302870 A1	16-03-2017
			BR 112017002884 A2	30-01-2018
			CA 2954601 A1	18-02-2016
			CN 107076746 A	18-08-2017
			EP 3180621 A1	21-06-2017
			JP 2017532633 A	02-11-2017
			KR 20170041907 A	17-04-2017
			RU 2017107750 A	17-09-2018
			US 2017235871 A1	17-08-2017
			US 2019237156 A1	01-08-2019
			WO 2016024278 A1	18-02-2016

WO 2016075483	A1	19-05-2016	CA 3003964 A1	19-05-2016
			CN 107106707 A	29-08-2017
			EP 3218013 A1	20-09-2017
			JP 2018500884 A	18-01-2018
			US 2018231548 A1	16-08-2018
			WO 2016075483 A1	19-05-2016

WO 0127628	A1	19-04-2001	AU 1083501 A	23-04-2001
			AU 1206701 A	23-04-2001
			WO 0126673 A1	19-04-2001
			WO 0127628 A1	19-04-2001

WO 2017127684	A1	27-07-2017	AU 2017210215 A1	19-07-2018
			BR 112018014146 A2	11-12-2018
			CA 3010895 A1	27-07-2017
			CN 109072280 A	21-12-2018
			EP 3405585 A1	28-11-2018
			JP 2019508062 A	28-03-2019
			WO 2017127684 A1	27-07-2017
