

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

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

3 086 952

②1 N° d'enregistrement national : **18 59274**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 12 Q 1/24 (2018.01), G 01 N 1/38, C 12 Q 1/02**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 08.10.18.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 10.04.20 Bulletin 20/15.

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) : BIOMERIEUX Société anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : COLIN BRUNO et GORSE FLORENCE.

⑦3 Titulaire(s) : BIOMERIEUX Société anonyme.

⑦4 Mandataire(s) : BIOMERIEUX Société anonyme.

⑤4 **PROCEDE DE PRELEVEMENT DE MICROORGANISMES A PARTIR D'UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE LIQUIDE OU VISQUEUX OU D'UNE SUSPENSION DE MICROORGANISMES FORTEMENT CONTAMINES.**

⑤7 La présente invention concerne un procédé de prélèvement de microorganismes à partir d'un échantillon biologique liquide ou visqueux (3) ou d'une suspension de microorganismes (3') ayant une concentration en microorganismes supérieure à 1.10^{-6} UFC/ml, ledit procédé comprenant:

- la mise en contact de l'échantillon (3) ou de la suspension (3') avec au moins une face plane (2) d'un support absorbant de sorte à obtenir un dépôt (4) de microorganismes (5) sur ladite au moins une face;

- le transfert de microorganismes (5) dudit dépôt sur la tranche plane (9) d'un fil plein (8) par la mise en contact de ladite tranche (9) avec ladite au moins une face plane (2) du support absorbant (1), ladite mise en contact formant une aire de contact entre ladite au moins une face et ladite tranche comprise entre $1,9 \times 10^{-3}$ et $200 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$.

FR 3 086 952 - A1



DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention a trait au domaine de la microbiologie, et trouve particulièrement application dans le domaine du diagnostic *in vitro*, notamment dans le domaine de l'analyse biologique.

5 La présente invention concerne en particulier un procédé de prélèvement de microorganismes à partir d'un échantillon biologique liquide ou visqueux ou d'une suspension de microorganismes fortement contaminés.

ETAT DE LA TECHNIQUE

10 L'utilisation des milieux de culture dans le domaine microbiologique est connue depuis de nombreuses décennies pour permettre la croissance, la détection, l'isolement et le dénombrement des microorganismes. Ces milieux de culture se retrouvent communément sous forme de gélose contenue dans une boîte de Pétri ou sous forme déshydratée appliquée sur un support, généralement un film.

15 L'isolement de microorganismes sur milieu de culture, à partir d'un échantillon à analyser ou d'une suspension de microorganismes, est une étape souvent indispensable à de nombreux procédés d'analyse microbiologique. Cette étape est notamment utilisée pour réaliser des identifications, vérifier la pureté microbienne d'un échantillon ou encore effectuer un dénombrement bactérien par comptage des colonies isolées ainsi obtenues.

A noter que dans le cadre d'un isolement microbiologique l'importance réside dans le caractère certain du prélèvement et non dans la précision du prélèvement.

20 L'isolement de microorganismes n'est possible qu'à partir d'un échantillon de départ faiblement contaminé. En effet, l'isolement de colonies à partir d'un échantillon fortement contaminé aura pour risque le chevauchement des surfaces des colonies, pouvant provoquer d'éventuelles interactions ou aura tendance à former seulement des micro-colonies du fait du manque de milieu nutritif. Ces micro-colonies n'étant pas toujours visibles à l'œil nu, le résultat de cette culture peut être analysé
25 comme faussement négatif.

Ainsi, lorsque l'échantillon de départ est largement contaminé (à savoir présente une concentration en microorganismes supérieure à 10^6 UFC/ml), la mise en œuvre de l'isolement nécessite la réalisation d'une série de dilutions afin d'obtenir une concentration finale appropriée pour
30 l'isolement. Traditionnellement, pour un échantillon comprenant 1.10^9 UFC/ml il sera nécessaire d'effectuer 7 dilutions décimales, soit autant d'étapes, pour obtenir un échantillon comprenant une centaine de microorganismes ou UFC (Unité Formant Colonie). Ainsi cette technique implique une prise d'essai plus importante et la consommation d'un nombre important de réactifs et matériel (milieu de culture, tubes de diluants, pipettes, etc.), générateur d'un volume élevé de déchets et d'étapes de traitement (autoclavage, coût du traitement). De plus, si un grand nombre de dilutions
35 est réalisé, il existe un risque de perdre, par l'effet de la dilution, le microorganisme cible, si celui-ci est présent en faible quantité par rapport à la microflore totale.

En particulier, dans les laboratoires d'analyse biologique, la préparation de solutions diluées est un poste chronophage et à faible valeur ajoutée. Notamment, un technicien de laboratoire passe une

bonne partie de son temps à préparer des tubes de dilution, à pipeter des solutions, à introduire les solutions pipetées dans les tubes de dilution et à homogénéiser les solutions mélangées obtenues au moyen d'un agitateur. Ces opérations manuelles rendent le technicien indisponible pour la mise en œuvre de tâches à plus forte valeur ajoutée, notamment la mise en œuvre des analyses biologiques elles-mêmes.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de procédé de dilution d'un échantillon, autre que la technique de dilutions en série, pour permettre l'isolement de microorganismes à des fins d'inoculation ou encore d'identification, simple à mettre en œuvre, à partir d'un échantillon à analyser ou d'une suspension de microorganismes fortement contaminés, et qui permet d'obtenir des colonies isolées ou des colonies dénombrables sur milieu de culture.

Ainsi l'objectif de la présente invention est de fournir un procédé qui permette en un nombre limité d'étapes de prélever quelques microorganismes à partir d'un échantillon biologique ou d'une suspension de microorganismes fortement contaminés.

Cet objectif est atteint par la présente invention qui propose un procédé de prélèvement de microorganismes à partir d'un échantillon biologique liquide ou visqueux ou d'une suspension de microorganismes ayant une concentration en microorganismes supérieure à 1.10^6 UFC/ml, ledit procédé comprenant :

- la mise en contact de l'échantillon ou de la suspension avec au moins une face plane d'un support absorbant de sorte à obtenir un dépôt de microorganismes sur ladite au moins une face ;
- le transfert de microorganismes dudit dépôt sur la tranche plane d'un fil plein par la mise en contact de ladite tranche avec ladite au moins une face plane du support absorbant, ladite mise en contact formant une aire de contact entre ladite au moins une face et ladite tranche comprise entre $1,9 \times 10^3$ et $200 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.

En d'autres termes, la mise en contact du support absorbant avec l'échantillon ou la suspension permet d'effectuer d'une part une première dilution de cet échantillon ou suspension et d'autre part d'obtenir un dépôt de microorganismes sans eau libre sur au moins une face du support absorbant. Ensuite la mise en contact de la tranche d'un fil plein avec le dépôt de microorganismes de la ou des faces du support absorbant permet le prélèvement de quelques microorganismes. Ainsi ce prélèvement de quelques microorganismes est effectué en seulement deux étapes.

Par prélèvement de microorganismes, on entend l'obtention d'une suspension comprenant moins de 500 microorganismes, de préférence moins de 300 microorganismes à partir d'un échantillon biologique ou une suspension de microorganismes ayant une concentration en microorganismes supérieure à 1.10^6 UFC/ml, de préférence comprise entre 1.10^6 et 1.10^{11} UFC/ml. Avantagusement le procédé permet l'obtention d'une suspension comprenant moins de 150, moins de 100, moins de 50, moins de 40, moins de 30, moins de 20, moins de 10, moins de 5 microorganismes.

L'homme du métier saura définir le nombre de microorganismes qu'il souhaite prélever en fonction de l'analyse qu'il souhaite faire. Ainsi pour une identification des microorganismes, un prélèvement

d'une dizaine de microorganismes est suffisant. Alors que pour une inoculation, un prélèvement de quelques unités à plusieurs centaines de microorganismes pourra être nécessaire.

Par UFC on entend Unité Formant Colonie. Il s'agit de l'unité utilisée pour le dénombrement en milieu solide des microorganismes vivants. Une UFC correspond à une colonie.

- 5 Les techniques de détermination de la concentration en microorganismes, ou dénombrement microbien, dans un échantillon biologique ou une suspension sont très largement connues de l'homme du métier. Le dénombrement peut se faire par comptage de colonies ou grâce à un dispositif automatisé. A titre d'exemple on peut citer les techniques suivantes, la méthode classique du comptage des colonies sur une gélose, la méthode Spiral® sur boîtes ou encore le système automatisé TEMPO® commercialisé par l'entreprise bioMérieux.
- 10

En microbiologie clinique, par échantillon biologique, il faut comprendre tout échantillon liquide ou visqueux, notamment d'origine humaine ou animale, susceptible de contenir un ou plusieurs types de microorganismes. Par exemple, un échantillon biologique appartient au groupe suivant : liquide amniotique, humeur aqueuse, bile, sang, sécrétion mamellaire, lavage broncho alvéolaire, liquide
15 cérébrospinal, chyle, chyme, fèces, liquide interstitiel, lymphes, menstruations, mucus, plasma, liquide pleural, pus, salive, sébum, sperme, sérum, crachat, sueur, fluide synovial, larme, urine et humeur vitrée. Echantillon biologique tissulaire issu de biopsie, tel que matière ou échantillon tissulaire, dégradé, haché, broyé et mélangé. De préférence, l'échantillon sera des fèces.

En microbiologie alimentaire, par échantillon biologique, il faut comprendre toute préparation
20 d'échantillon alimentaire sous forme liquide ou visqueuse, susceptible de contenir un ou plusieurs types de microorganismes.

On entend par solution liquide et/ou visqueuse au sens de la présente demande, un échantillon qui s'écoule sous son propre poids à une température atmosphérique, de préférence comprise entre 10 et 50°C.

- 25 Par liquide, on entend une viscosité inférieure ou égale à 50 Pa.s (Pascal seconde) à une température atmosphérique, de préférence comprise entre 10 et 50°C. Le terme visqueux doit être compris comme étant une viscosité supérieure à 50 Pa.s à une température atmosphérique, de préférence comprise entre 10 et 50°C. Préférentiellement elle est comprise entre 50 et 200 Pa.s à une température atmosphérique, de préférence comprise entre 10 et 50°C. Au-dessus de 200 Pa.s, on
30 parlera de matière solide.

L'échantillon biologique peut être obtenu à partir d'une suspension de matière biologique. Une telle suspension est obtenue traditionnellement par remise en suspension d'une ou plusieurs colonies de matière biologique, par exemple dans une solution saline.

- 35 Au sens de la présente invention, le terme microorganisme recouvre les bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, les levures, les moisissures, les spores microbiennes, les amibes et plus généralement, les organismes unicellulaires, invisibles à l'œil nu.

Lorsque le procédé de prélèvement s'effectue à partir d'une suspension de microorganismes, une étape préalable d'homogénéisation est avantageusement mise en œuvre.

Selon un mode de réalisation, les microorganismes sont des bactéries à Gram négatif. A titre d'exemples de bactéries à Gram négatif, on peut citer les bactéries des genres suivants : *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Serratia*.

5 Selon un autre mode de réalisation, les microorganismes sont des bactéries à Gram positif. A titre d'exemples de bactéries à Gram positif, on peut citer les bactéries des genres suivants : *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Mycobacteria*, *Nocardia*, *Corynebacteria*, *Micrococcus* et *Deinococcus*.

Selon encore un autre mode de réalisation, les microorganismes sont levures. A titre d'exemples de levures, on peut citer les genres suivants : *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* et *Trichosporon*.

10 Avantageusement, lorsque les microorganismes ont une taille qui varie entre 0,2 à 3 μm et qu'ils sont prélevés à partir d'un échantillon biologique liquide ou visqueux ou d'une suspension de microorganismes ayant une concentration supérieure à $1 \cdot 10^8$ UFC/ml, l'aire de contact formée entre de la face plane du support absorbant et la tranche du fil plein est comprise entre $1,9 \times 10^3$ et $70 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.

15 En effet, compte tenu de leur taille et de leur densité dans un échantillon ou une suspension très largement contaminés (au-delà de $1 \cdot 10^8$ UFC/ml), cette caractéristique permet d'en prélever une quantité limitée (inférieure à 300 UFC). Une aire de contact inférieure à $1,9 \times 10^3$ impliquerait d'une part l'utilisation d'un fil dont le diamètre le rendrait difficilement manipulable et d'autre part une dilution trop importante de l'échantillon. Ceci pourrait avoir pour conséquence d'avoir un échantillon
20 dilué sans microorganisme et ainsi rendre un résultat d'analyse comme faussement négatif. Alors qu'une aire de contact supérieure à $70 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ aura pour conséquence de prélever une quantité trop importante de microorganismes. Le prélèvement d'une quantité trop importante de microorganismes ne permettra pas un isolement de microorganismes efficace et aura pour risque le chevauchement des surfaces des colonies, de provoquer d'éventuelles interactions ou aura tendance
25 à former seulement des micro-colonies du fait du manque de milieu nutritif.

Avantageusement, lorsque les microorganismes ont une taille qui varie entre 0,2 à 1,5 μm et qu'ils sont prélevés à partir d'un échantillon biologique liquide ou visqueux ou d'une suspension de microorganismes ayant une concentration supérieure à $1 \cdot 10^8$ UFC/ml, l'aire de contact formée entre la face plane du support absorbant et la tranche du fil plein est comprise entre $1,9 \times 10^3$ et
30 $18 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.

Avantageusement, lorsque les microorganismes ont une taille qui varie entre 5 à 50 μm et qu'ils sont prélevés à partir d'un échantillon biologique liquide ou visqueux ou d'une suspension de microorganismes ayant une concentration supérieure à $1 \cdot 10^6$ UFC /ml, l'aire de contact formée entre de la face plane du support absorbant et la tranche du fil plein est comprise entre 30×10^3 et
35 $200 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, de préférence entre 30×10^3 et $130 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. Cette caractéristique permet de prélever la quantité de microorganismes nécessaire à l'isolement. En effet l'aire de contact ne doit pas être supérieure à $200 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ au risque d'en prélever une quantité trop importante. Ceci ayant les conséquences décrites ci-dessus.

Dans sa position de contact avec l'échantillon biologique ou avec la suspension de microorganismes, le support absorbant comprend au moins une surface de contact avec l'échantillon biologique ou la suspension de microorganismes, chaque surface définit un plan. Lorsqu'il y a deux surfaces de contact deux plans sont définis, les deux plans étant sensiblement parallèles.

- 5 Au sens de la présente invention, une surface de contact est une surface du support absorbant apte à rentrer en contact avec l'échantillon biologique ou la suspension de microorganismes afin d'obtenir un dépôt de microorganismes sur cette face. Cette surface de contact est une surface sensiblement plane. Le contour du plan formé par la surface de contact peut prendre une grande variété de formes. Il peut notamment être circulaire ou encore rectangulaire.
- 10 Par « obtenir un dépôt de microorganismes », on entend obtenir un film d'échantillon ou de suspension sur la face du support. Ainsi le liquide s'étale totalement sur l'échantillon jusqu'à former un film sans former de goutte. On parle alors de mouillage total de cette face. Autrement dit la face plane du support doit être humide mais non mouillée. Un tel phénomène physique sera lié aux caractéristiques physiques du support absorbant. L'homme du métier saura choisir, à partir de ses
- 15 connaissances, le support absorbant qui permettra d'obtenir un dépôt de microorganismes sans eau libre.

Selon l'invention le film d'échantillon a une épaisseur de quelques μm à quelques dizaines de μm , de préférence inférieure à 100 μm .

- 20 Par support absorbant on entend un matériau poreux capable d'absorber, par exemple par capillarité une certaine quantité de liquide. Par exemple, il s'agit d'un matériau poreux composé de petits espaces de vide ou de cavités appelés pores, séparés par une matrice solide.

Les pores du support absorbant selon la présente invention ont une dimension qui leur permet d'absorber la partie liquide de l'échantillon ou de la suspension sans absorber les microorganismes.

- 25 Selon un mode de réalisation, le support absorbant a des pores dont la taille est inférieure ou égale 0,45 μm , de préférence inférieure ou égale à 0,2 μm . Ces caractéristiques permettent d'éviter l'absorption des microorganismes dans le support absorbant.

- 30 Parmi les techniques expérimentales les plus utilisées pour déterminer la taille de pores des matériaux poreux, on distingue les méthodes traditionnelles comme, la porosimétrie au mercure et la technique de l'isotherme d'adsorption, ainsi que les méthodes alternatives comme la thermoporométrie par l'analyse calorimétrique ou par la résolution RMN3, la diffusion aux petits angles (neutrons ou rayons X) et la stéréologie.

- 35 Selon un mode de réalisation, la partie d'échantillon transférée sur la face plane du support absorbant, lors de la mise en contact avec l'échantillon biologique ou la suspension de microorganismes, a un volume inférieur à 1 ml. Cette caractéristique permet d'éviter un surplus de liquide sur le support absorbant.

Dans le cadre de la présente invention, la mise en contact de l'échantillon ou de la suspension avec une face plane d'un support absorbant se fait sans délitement du support absorbant. Avantagusement, la mise en contact de l'échantillon ou de la suspension avec une face plane d'un

support absorbant se déroule pendant une durée inférieure à 5 secondes, en particulier inférieure à 2 secondes. Une telle durée permet d'éviter le délitement du support absorbant.

Le procédé selon la présente invention comprend, en outre, une étape de transfert de microorganismes du dépôt sur la tranche plane d'un fil plein par la mise en contact de ladite tranche avec la face plane du support absorbant.

Par fil on entend un cylindre de faible section et de longueur permettant sa préhension ou son accrochage, de section circulaire ou non. Le fil pourra être en tous types de matériau, tels que le métal ou le plastique.

Préférentiellement, le fil sera en matériau métallique. Cette caractéristique permet une stérilisation du fil par la chaleur, par exemple, par autoclavage.

A titre d'exemples, on peut citer le fil de fer, le fil de cuivre, le fil d'étain, le fil d'or, le fil d'argent ou encore le fil de tungstène.

Lorsque que le fil est en matériau plastique, il sera préférentiellement en nylon.

Par tranche plane d'un fil plein on entend une section perpendiculaire, ou sensiblement perpendiculaire, à l'axe du fil. La tranche du fil peut se faire par toute technique connue de l'homme du métier permettant la section perpendiculaire à l'axe du fil. Dans le cadre de la présente, la tranche du fil est plane ou sensiblement plane. Selon un mode de réalisation, l'angle que forme la tranche plane du fil plein avec l'axe du fil plein est de 90°.

Selon un mode de réalisation, le fil plein est de section circulaire et a un diamètre compris entre 50 μm et 500 μm , de préférence entre 60 μm et 300 μm . Ces caractéristiques permettent au fil plein de former une aire de contact comprise $1,9 \times 10^3$ et $200 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.

Selon la présente invention, on peut ajuster le diamètre du fil plein en fonction de la taille du microorganisme, de sa concentration et du nombre de microorganismes que l'on souhaite prélever. Ainsi plus le fil sera fin, moins on prélèvera de microorganismes. L'homme du métier, à partir de ses connaissances et des enseignements de la présente invention, saura ajuster le diamètre du fil selon le microorganisme et le nombre qu'il souhaite en prélever. A titre d'exemple on peut citer la méthode essai et erreur caractérisée par des essais de plusieurs diamètres de fil plein jusqu'à obtenir la quantité souhaitée de microorganismes.

Avantageusement, lorsque le microorganisme a une taille qui varie entre 0,2 et 1,5 μm , le fil plein est de section circulaire et a un diamètre compris entre 60 μm et 150 μm . Ces caractéristiques permettent au fil plein de former une aire de contact comprise $1,9 \times 10^3$ et $18 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.

Avantageusement, lorsque le microorganisme a une taille qui varie entre 0,2 et 3 μm , le fil plein a un diamètre compris entre 60 μm et 300 μm . Ces caractéristiques permettent au fil plein de former une aire de contact comprise $1,9 \times 10^3$ et $70 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.

Avantageusement, lorsque le microorganisme a une taille qui varie entre 5 et 50 μm , le fil plein a un diamètre compris entre 300 μm et 500 μm , de préférence entre 300 μm et 400 μm . Ces

caractéristiques permettent au fil plein de former une aire de contact comprise entre 30×10^3 et $200 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, de préférence comprise entre 30×10^3 et $130 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.

5 La mise en contact se fait entre la tranche du fil plein uniquement et la face plane du support absorbant. Autrement dit il y a un mouillage limité, voire nul, des flancs du fil, du fait de l'absence d'eau libre disponible à partir du support absorbant.

L'aire de contact, selon la présente invention, est la surface de contact entre la tranche plane du fil plein et au moins une partie de la face plane du support absorbant comprenant le dépôt de microorganismes.

10 Dans un mode de réalisation, le transfert d'une partie de l'échantillon sur le support absorbant comporte l'étalement de la partie de l'échantillon ou de la suspension sur et/ou dans le support absorbant par gravité. L'effet technique de cette caractéristique est l'étalement du « trop plein » éventuel de liquide.

15 Dans un mode de réalisation particulier, l'extrémité du fil en contact avec le support absorbant est mouillé. Par mouillé on entend que l'extrémité du fil a été humidifiée par un liquide, de préférence liquide physiologique. L'effet technique de cette caractéristique est de permettre un prélèvement plus important de microorganismes, sans modifier le diamètre du fil.

L'invention a également pour objet un procédé de détection et/ou d'identification de microorganismes compris dans un échantillon biologique liquide ou visqueux ayant une concentration en microorganismes supérieure à 1.10^6 UFC/ml, ledit procédé comprenant :

- 20
- le prélèvement de microorganismes de l'échantillon en mettant en œuvre un procédé de prélèvement de microorganismes selon l'invention,
 - la mise en contact dudit prélèvement, avec un milieu réactionnel,
 - incubation du milieu réactionnel de façon à permettre la croissance des microorganismes, et
 - la détection et/ou l'identification desdits microorganismes prélevés.

25 Par détection, on entend déceler à l'œil nu ou à l'aide d'un appareil optique l'existence d'une croissance des microorganismes cibles. Avantageusement, lorsque le milieu mis en œuvre comprend un substrat chromogène, la détection peut également permettre une identification taxonomique des microorganismes cibles. La détection se fait à l'œil nu ou à l'aide d'un appareil optique ou numérique pour les substrats fluorescents et pour les substrats colorés.

30 Par milieu réactionnel, on entend un milieu comprenant tous les éléments nécessaires à l'expression d'un métabolisme et/ou à la croissance de microorganismes. Le milieu réactionnel peut être solide, semi-solide ou liquide. Par milieu solide, on entend par exemple un milieu gélifié, ou gélosé. L'agar est l'agent gélifiant traditionnel en microbiologie pour la culture des microorganismes, mais il est possible d'utiliser de la gélatine, de l'agarose ou d'autres gélifiants naturels ou artificiels seuls ou en
35 combinaison.

Un certain nombre de milieux de culture sont disponibles dans le commerce, comme par exemple la gélose Columbia, la gélose Trypcase-soja, la gélose Mac Conkey, la gélose Mueller Hinton ou plus généralement celles décrites dans le Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

Le milieu réactionnel peut comprendre un ou plusieurs éléments en combinaison, tels que des acides aminés, des peptones, des hydrates de carbone, des nucléotides, des minéraux ou encore des vitamines. Le milieu peut comprendre également un colorant. A titre indicatif, on peut citer comme colorant le bleu d'Evans, du rouge neutre, du sang de mouton, du sang de cheval, un opacifiant tel que l'oxyde de Titane ou le kaolin, de la nitroaniline, du vert malachite, du vert brillant, un ou plusieurs indicateurs métaboliques, un ou plusieurs régulateurs métaboliques.

L'invention a également pour objet un procédé d'inoculation de microorganismes dans un échantillon biologique liquide ou visqueux, ledit procédé comprenant :

- le prélèvement de microorganismes de l'échantillon en mettant en œuvre un procédé de prélèvement de microorganismes selon l'invention ;
- l'inoculation desdits microorganismes prélevés à l'étape précédente.

Par inoculation on entend l'introduction d'un microorganisme dans un milieu de culture par ensemencement.

Dans le cadre du procédé d'inoculation, le prélèvement de microorganismes consiste préférentiellement en l'obtention d'une solution comprenant moins de 150 microorganismes à partir d'un échantillon biologique ou une suspension de microorganismes ayant une concentration en microorganisme supérieure à 1.10^6 UFC/ml, de préférence comprise entre 1.10^6 et 1.10^9 UFC/ml.

L'invention a également pour objet un kit de prélèvement de microorganismes compris dans un échantillon biologique liquide ou visqueux comprenant :

- un fil plein ayant une tranche plane de diamètre compris entre 50 et 500 μm ; et
- un support absorbant ayant des pores de diamètre inférieur ou égal 0,45 μm , de préférence inférieur ou égal 0,20 μm .

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront au vu de la description qui va suivre et des exemples développés ci-après, qui se réfèrent aux figures annexées, dans lesquelles des références identiques désignent des éléments identiques ou équivalents et dans lesquelles :

- la figure 1A est une vue en coupe schématique d'une bande papier absorbant et d'un échantillon biologique illustrant un mode de réalisation du procédé selon l'invention de mise en contact de l'échantillon biologique avec au moins une face plane de ladite bande de papier absorbant de sorte à obtenir un dépôt de microorganismes sur ladite face ;
- la figure 1B est une vue en coupe schématique d'un papier absorbant et d'une suspension de microorganismes illustrant un autre mode de réalisation du procédé selon l'invention de mise en contact de la suspension avec au moins une face plane de ladite bande de papier absorbant de sorte à obtenir un dépôt de microorganismes sur ladite face ;
- la figure 2 est une vue en coupe schématique d'un dépôt de microorganismes sur une face plane d'une bande de papier absorbant ;
- la figure 3 est une vue en coupe schématique d'un fil plein et d'une bande de papier absorbant comprenant un dépôt de microorganismes illustrant une étape d'un procédé selon l'invention de transfert de microorganismes dudit dépôt sur la tranche plane d'un fil plein par

la mise en contact de la tranche du fil plein avec ladite face plane de la bande de papier absorbant ;

- la figure 4 est une coupe schématique d'un fil plein comprenant un prélèvement de microorganismes et une boîte de Pétri illustrant le procédé de détection et/ou d'identification de microorganismes et plus particulièrement la mise en contact du prélèvement, avec un milieu réactionnel.
- la figure 5 est une coupe schématique d'un fil plein comprenant un prélèvement de microorganismes et une suspension illustrant le procédé d'inoculation de microorganismes.

Ces exemples ont pour but de faciliter la compréhension de l'invention, sa mise en œuvre et son utilisation. Ces exemples sont donnés à titre explicatif et ne sauraient limiter la portée de l'invention.

EXEMPLES

Sur la figure 1A, la face plane **2** de l'extrémité d'une bande de papier absorbant **1** formant support absorbant est manuellement mis au contact d'un échantillon visqueux de fèces **3** par un utilisateur tenant ladite bande par son autre extrémité de sorte à obtenir un dépôt **4** de microorganismes **5**, illustré à la figure 2, sur ladite au moins une face **2**.

Sur la figure 1B, la face plane **2** l'extrémité d'une bande de papier absorbant **1** formant support absorbant est manuellement mis au contact une suspension de microorganismes **3'** par un utilisateur tenant ladite bande par son autre extrémité de sorte à obtenir un dépôt **4** de microorganismes **5**, illustré à la figure 2, sur ladite au moins une face **2**.

Sur la figure 2, un dépôt **4** de microorganismes **5** formant un film **6** sur la face plane **2** d'une bande de papier absorbant **1**. Ainsi le liquide s'étale complètement sur les microorganismes **5** pour former un film sans former de gouttes. La bande de papier absorbant **1** comprend des pores **7** dont la taille est inférieure ou égale à $0,45 \mu\text{m}$. Ces pores permettent d'absorber la partie liquide de l'échantillon ou de la suspension sans absorber les microorganismes **5**.

Sur la figure 3, la tranche plane **9** d'un fil plein **8** est mise en contact avec la face plane **2** d'une bande de papier absorbant **1** comprenant le dépôt **4** de microorganismes **5** pour permettre le transfert de microorganismes dudit dépôt **4** sur la tranche plane **9** du fil plein.

La tranche plane **9** du fil plein **8** forme un angle α avec l'axe du fil plein **8**. L'angle α est de 90° . Cette caractéristique permet un prélèvement suffisant de microorganismes sur la tranche du fil plein. Un angle α en dehors de cette gamme aura pour conséquence un prélèvement insuffisant voire nul.

Sur la figure 4, la tranche plane **9** d'un fil plein **8**, comprenant un dépôt **4** de microorganismes **5** suite à la mise en contact avec la face plane **2** d'une bande de papier absorbant **1** comprenant le dépôt **4** de microorganismes **5**, est mise en contact avec un milieu réactionnel **11** dans un boîte de Pétri **10**. Les microorganismes présents sur la tranche plane **9** sont étalés en en stries serrées **12** sur le milieu réactionnel **11** pour permettre leur isolement et ainsi permettre leur détection et/ou identification de microorganismes. Comme expliqué précédemment, l'isolement peut également permettre le dénombrement de microorganismes.

Sur la figure 5, la tranche plane **9** d'un fil plein **8**, comprenant un dépôt **4** de microorganismes **5** suite à la mise en contact avec la face plane **2** d'une bande de papier absorbant **1**, comprenant le dépôt **4** de microorganismes **5**, est mise en suspension dans une suspension **13** illustrant ainsi le procédé d'inoculation de microorganismes selon l'invention dans une suspension.

5

Prélèvement de bactéries à Gram négatif à partir d'une suspension

Afin d'illustrer l'invention et uniquement à titre d'exemple, les inventeurs ont prélevé selon le procédé de l'invention des microorganismes à partir deux suspensions de bactéries à Gram négatif, la première étant une suspension d'*Escherichia coli* (ATCC® 8739™), dont la taille varie entre 0,5 à 3 µm et la seconde une suspension de *Citrobacter freundii*, dont la taille varie entre 0,5 à 5 µm. Le dénombrement de chaque suspension est effectué par la méthode classique de comptage.

10

Escherichia coli, également appelée colibacille et abrégée en *E. coli*, est une bactérie intestinale (Gram négatif) des Mammifères, très commune chez l'être humain. Certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou sepsis.

15

Les citrobacters constituent un genre de bactéries, à Gram négatif, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. *Citrobacter freundii* peut être responsable d'infections urinaires, d'infections de plaies ou encore de septicémies. Ce germe est fréquemment isolé en milieu hospitalier.

Pour commencer, les inventeurs ont mis en contact une face d'un support absorbant avec une suspension d'*Escherichia coli* (ATCC® 8739™) de 1.10^9 UFC/ml et une suspension de *Citrobacter freundii* (CQ® 105™) comprenant 8.10^8 UFC/ml.

20

Un dépôt de microorganismes se forme sur une des faces du support absorbant.

Ensuite, les inventeurs ont réalisé la seconde étape du procédé de l'invention de mise en contact de la tranche d'un fil plein avec la face plane du support absorbant comprenant le dépôt de microorganismes.

25

Trois fils pleins en cuivre de diamètres 80 µm, 140 µm et 240 µm ont été utilisés, pour le prélèvement de la suspension d'*Escherichia coli*. Un fil plein de cuivre de diamètre 80 µm a été utilisé pour la suspension de *C. freundii*. Ainsi les fils de diamètre 80 µm forment une aire de contact avec la face du support absorbant de $5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, le fil de 140 µm une aire de contact de $15,4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ et le fil de 240 µm une aire de contact de $45,2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.

30

Une fois le transfert de microorganismes sur la tranche plane du fil plein réalisé selon l'invention, les microorganismes sont étalés sur une gélose Trypto-caséine soja (TSA) à l'aide d'un fil selon l'invention permettant ainsi leur dénombrement, tel que montré sur la figure 3.

La gélose Trypto-caséine soja (TSA) est un milieu universel convenant pour un large éventail d'emplois. Du fait de son excellente nutritivité, elle peut être utilisée, d'une part pour la culture et l'isolement des bactéries aérobies et anaérobies, d'autre part pour favoriser la croissance des germes particulièrement exigeants.

35

Les boîtes de Pétri sont, ensuite, incubées aux températures requises pour la croissance des microorganismes recherchés après l'étalement.

Toutes les colonies présentes sur la boîte de Pétri sont dénombrées visuellement par comptage. La méthode classique de comptage de colonies permet de connaître le nombre d'unités prélevées pouvant former une colonie par millilitre (UFC/ml). Selon cette technique, chaque colonie formée à la surface de la gélose provient d'une bactérie.

40

Pour chaque fil de diamètres différents, cinq prélèvements différents ont été réalisés, puis les microorganismes ont été étalés sur une boîte de Pétri TSA et pour finir dénombrés comme expliqué ci-dessus. Les résultats des dénombrements sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Souches	Diamètre du fil plein (µm)	Nombre d'essais	Dénombrements (UFC/boîte)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 8739™) 1.10 ⁹ UFC/ml	80 µm	5	1 ; 6 ; 11 ; 16 ; 18
	140 µm	5	76 ; 128 ; 141 ; 150
	240 µm	5	56 ; 164 ; 200 ; 200 ; 200
<i>Citrobacter freundii</i> (CQ® 105™) 8.10 ⁸ UFC/ml	80 µm	5	2 ; 3 ; 4 ; 6 ; 23

5

Ces résultats de dénombrement montrent qu'à partir de suspensions de microorganismes fortement contaminées (1.10⁹ et 8.10⁸ UFC/ml), le procédé selon l'invention permet en un nombre limité d'étapes de prélever quelques microorganismes (inférieur ou égal 200 microorganismes).

De plus, ces résultats montrent que le procédé est reproductible avec différents diamètres de fil allant de 80 à 240 µm et sur différents type de bactérie à Gram négatif.

10

A noter également que chaque essai réalisé permet toujours le prélèvement d'au moins une bactérie.

Prélèvement de bactéries à Gram positif à partir d'une suspension

Pour montrer que le procédé selon l'invention ne se limite pas à un seul type de microorganismes ou encore à seul type de matériau pour le fil, les inventeurs ont réalisé un procédé de prélèvement d'une bactérie à Gram positif, tels que *Staphylococcus aureus*, dont la taille varie 0,5 à 1 µm, et *Listeria ivanovii*, dont la taille varie 0,5 à 2 µm, à l'aide d'un fil de cuivre et de nylon.

15

20

Les staphylocoques sont des bactéries impliquées dans des pathologies variées et de degrés de gravité divers. Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*), bactérie à Gram positif, est la souche de staphylocoque la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire. Avec la bactérie *Escherichia coli* elle est au premier rang des germes responsables d'infections nosocomiales (infections contractées à l'hôpital). Ces germes sont également responsables d'intoxications alimentaires.

Les *Listeria* sont des bacilles de petite taille, mobiles grâce à des flagelles, à Gram positif.

Pour cette expérience, deux prélèvements sont effectués à partir d'une suspension de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™) de 1.10⁸ UFC/ml et d'une suspension de *Listeria ivanovii* (ATCC® 700402™) de 1.10⁷ UFC/ml.

25

30

Les fils utilisés sont des fils pleins de cuivre de 80 µm de diamètre et un fil plein de nylon de 300 µm de diamètre. L'aire de contact formée entre la face du support absorbant et la tranche du fil plein est de 5 x 10³ µm² pour les fils de 80 µm et 70,7 x 10³ µm².

Les étapes de prélèvements, d'étalements, d'isolement et dénombrement sont réalisées telles que décrit précédemment. Les résultats des dénombrements sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous.

35

Tableau 2

Souches	Matériau et diamètre du fil plein	Nombre d'essais	Dénombrements (UFC/boîte)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 6538™) 1.10 ⁸ UFC/ml	Fil de cuivre 80 µm	4	6 ; 11 ; 17 ; 20
	Fil de nylon 300 µm	3	69 ; 256 ; 385
<i>Listeria ivanovii</i> (ATCC® 700402™) 1.10 ⁷ UFC/ml	Fil de cuivre 80 µm	3	2 ; 2 ; 36

5 Ainsi les résultats montrent que le procédé permet un prélèvement de quelques bactéries à Gram positif à partir d'une suspension de *Staphylococcus aureus* ou encore de *Listeria ivanovii* fortement contaminées respectivement à 1.10⁸ UFC/ml et 1.10⁷ UFC/ml. De plus, cette expérience montre que le procédé est réalisable à l'aide de fils en différents matériaux et de différents diamètres. Là encore à chaque essai effectué des bactéries sont prélevées.

10 Prélèvement d'une souche de *Candida albicans* (ATCC® 10231™) à partir d'une suspension

Et pour finir, les inventeurs ont appliqué le procédé de prélèvement selon l'invention à deux suspensions de levure *Candida albicans* (ATCC® 10231™), dont la taille varie de 6 à 10 µm, de différentes concentrations. La première ayant une concentration en *Candida* de 3.10⁶ UFC/ml alors que la seconde a une concentration de 6.10⁶ UFC/ml.

15 Dans cette expérience, un fil plein de nylon de 300 µm de diamètre est utilisé dans deux conditions, soit le fil est sec soit il est mouillé.

Candida albicans est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. C'est un organisme vivant à l'état naturel dans les muqueuses de l'être humain. Elle provoque des infections fongiques (candidiase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique. Les candidoses sont une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés comme les patients atteints du sida, les patients cancéreux sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse. Les résultats des dénombrements sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3

Souches	Matériau et diamètre du fil plein	Nombre d'essais	Dénombrements (UFC/boîte)
<i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231™) 3.10 ⁶ UFC/ml	Fil de nylon sec 300 µm	4	1 ; 2 ; 4 ; 6
<i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231™) 6.10 ⁶ UFC/ml	Fil de nylon mouillé 300 µm	6	2 ; 5 ; 6 ; 7 ; 11 ; 13

25 De manière identique aux autres microorganismes, cette expérience montre que le procédé fonctionne également sur une suspension de levures.

De plus cette expérience montre qu'à partir de suspensions de *Candida albicans* de concentrations différentes, allant du simple au double, le procédé permet d'obtenir des prélèvements inférieurs à 13 microorganismes.

Pour finir, cette expérience démontre également l'effet technique de la caractéristique « mouillé » explicitée précédemment. A savoir de permettre un prélèvement plus important de microorganismes. De manière identique à précédemment, cette expérience montre le caractère certain du prélèvement d'au moins un microorganisme à chaque essai.

5

La présente invention présente ainsi les avantages suivants :

- fournir un procédé de prélèvement de quelques microorganismes à partir d'un échantillon biologique ou d'une suspension de microorganismes fortement contaminés en un nombre limité d'étapes ;
- 10 - fournir un procédé reproductible et applicable à différents type de microorganismes.
- fournir un procédé de prélèvement compatible avec la détection et/ou l'identification des microorganismes ;
- fournir un procédé de prélèvement compatible également avec l'inoculation des microorganismes ;
- 15 - fournir un procédé de prélèvement permettant de maitriser l'inoculation à très bas niveau (quelques cellules), pour la préparation d'échantillons artificiellement contaminés.
- fournir un procédé permettant de réaliser un prélèvement certain de microorganismes de manière plus simple et moins couteuse que les méthodes actuelles.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de prélèvement de microorganismes à partir d'un échantillon biologique liquide ou visqueux (3) ou d'une suspension de microorganismes (3') ayant une concentration en microorganismes supérieure à 1.10^6 UFC/ml, ledit procédé comprenant :
- 5
- la mise en contact de l'échantillon (3) ou de la suspension (3') avec au moins une face plane (2) d'un support absorbant de sorte à obtenir un dépôt (4) de microorganismes (5) sur ladite au moins une face ;
 - le transfert de microorganismes (5) dudit dépôt sur la tranche plane (9) d'un fil plein (8) par la mise en contact de ladite tranche (9) avec ladite au moins une face plane (2) du support absorbant (1), ladite mise en contact formant une aire de contact entre ladite au moins une face et ladite tranche comprise entre $1,9 \times 10^3$ et $200 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.
- 10
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel :
- 15
- les microorganismes (5) ont une taille qui varie entre 0,2 à 3 μm et sont prélevés à partir d'un échantillon biologique liquide ou visqueux (3) ou d'une suspension de microorganismes (3') ayant une concentration supérieure à 1.10^8 UFC/ml, et
 - l'aire de contact entre la au moins une face plane (2) du support absorbant et la tranche plane (9) d'un fil plein (8) est comprise entre $1,9 \times 10^3$ et $70 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.
- 20
3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel :
- les microorganismes (5) ont une taille qui varie entre 0,2 à 1,5 μm et sont prélevés à partir d'un échantillon biologique liquide ou visqueux (3) ou d'une suspension de microorganismes (3') ayant une concentration supérieure à 1.10^8 UFC/ml, et
 - l'aire de contact entre la au moins une face plane du support absorbant et la tranche plane (9) d'un fil plein (8) est comprise entre $1,9 \times 10^3$ et $18 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.
- 25
4. Procédé selon la revendication 1, dans lequel :
- les microorganismes (5) ont une taille qui varie entre 5 à 50 μm et sont prélevés à partir d'un échantillon biologique liquide ou visqueux (3) ou d'une suspension de microorganismes (3') ayant une concentration supérieure à 1.10^6 UFC/ml, et
 - l'aire de contact entre la au moins une face plane du support absorbant et la tranche plane (9) d'un fil plein (8) est comprise entre 30×10^3 et $200 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.
- 30
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le support absorbant a des pores dont la taille est inférieure ou égale 0,45 μm , de préférence inférieure ou égale à 0,2 μm .
- 35
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la partie d'échantillon transférée sur ladite face plane dudit support absorbant a un volume inférieur à 1 ml.
- 40

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la mise en contact de la tranche plane (9) d'un fil plein (8) avec la face plane (2) du support absorbant se déroule pendant une durée inférieure à 5 secondes, en particulier inférieure à 2 secondes.
- 5 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la tranche plane (9) d'un fil plein (8) a un diamètre compris entre 50 et 500 μm , de préférence entre 60 μm et 300 μm .
- 10 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le fil plein est métallique.
- 10 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel le fil plein est en plastique.
- 15 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le transfert d'une partie de l'échantillon (3) ou de la suspension (3') sur le support absorbant comporte l'étalement de la partie de l'échantillon sur et/ou dans le support absorbant par gravité.
- 20 12. Procédé de détection et/ou d'identification de microorganismes compris dans un échantillon biologique liquide ou visqueux (3) ou dans une suspension de microorganismes (3') ayant une concentration en microorganismes supérieure à 1.10^6 UFC/ml, ledit procédé comprenant :
- 25
- le prélèvement de microorganismes (5) de l'échantillon en mettant en œuvre un procédé de prélèvement de microorganismes selon l'une quelconque des revendications 1 à 11,
 - la mise en contact dudit prélèvement, avec un milieu réactionnel,
 - incubation l'ensemble de façon à permettre la croissance des microorganismes (5), et
 - la détection et/ou l'identification desdits microorganismes (5) prélevés.
- 30 13. Procédé d'inoculation de microorganismes (5) compris un échantillon biologique liquide ou visqueux (3) ou dans une suspension de microorganismes (3') ayant une concentration en microorganismes 5 supérieure à 1.10^6 UFC/ml, ledit procédé comprenant :
- 35
- le prélèvement de microorganismes (5) de l'échantillon selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 ;
 - l'inoculation desdits microorganismes (5) prélevés à l'étape précédente.
- 40 14. Kit de prélèvement de microorganismes (5) compris dans un échantillon biologique liquide ou visqueux (3) ou dans une suspension de microorganismes (3') comprenant :
- un fil plein (8) ayant une tranche plane (9) de diamètre compris entre 50 et 500 μm ;
 - et
 - un support absorbant ayant des pores de diamètre inférieur ou égal 0,45 μm , de préférence inférieur ou égal 0,20 μm .

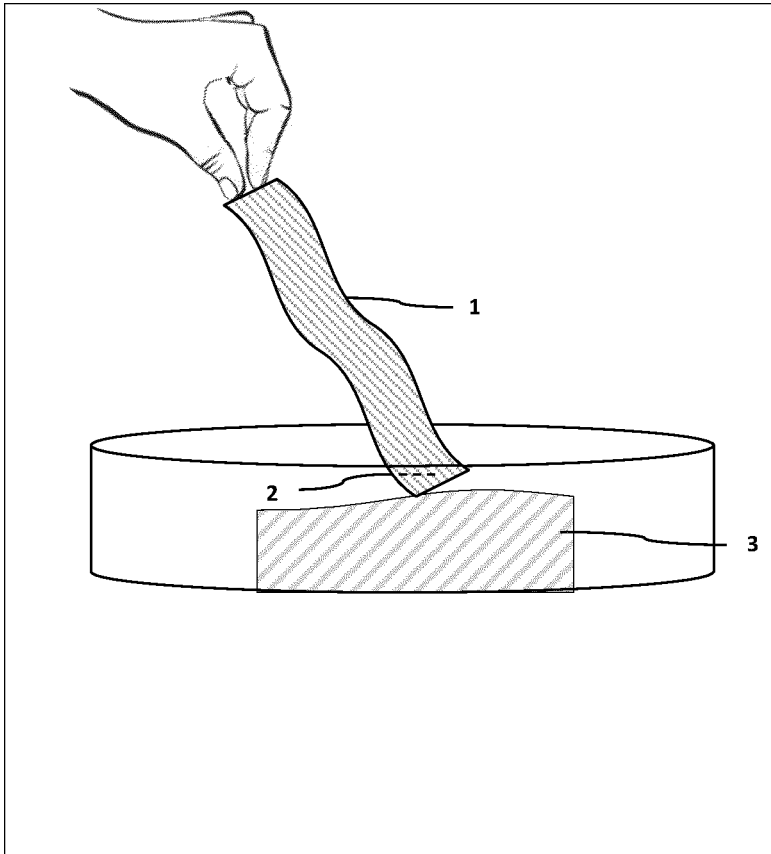


FIGURE 1A

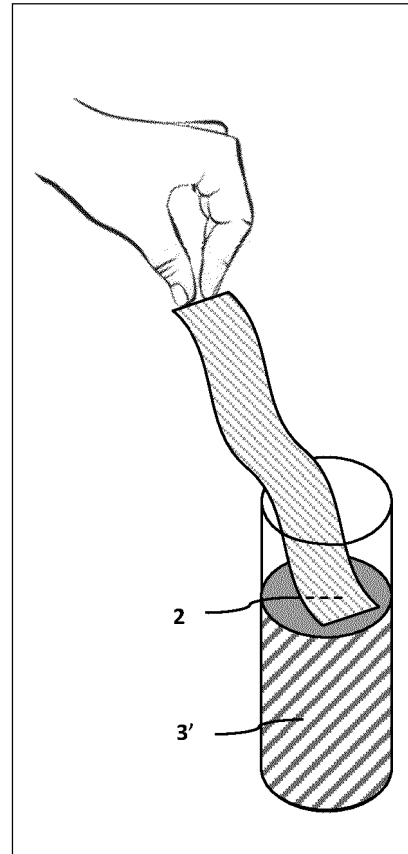


FIGURE 1B

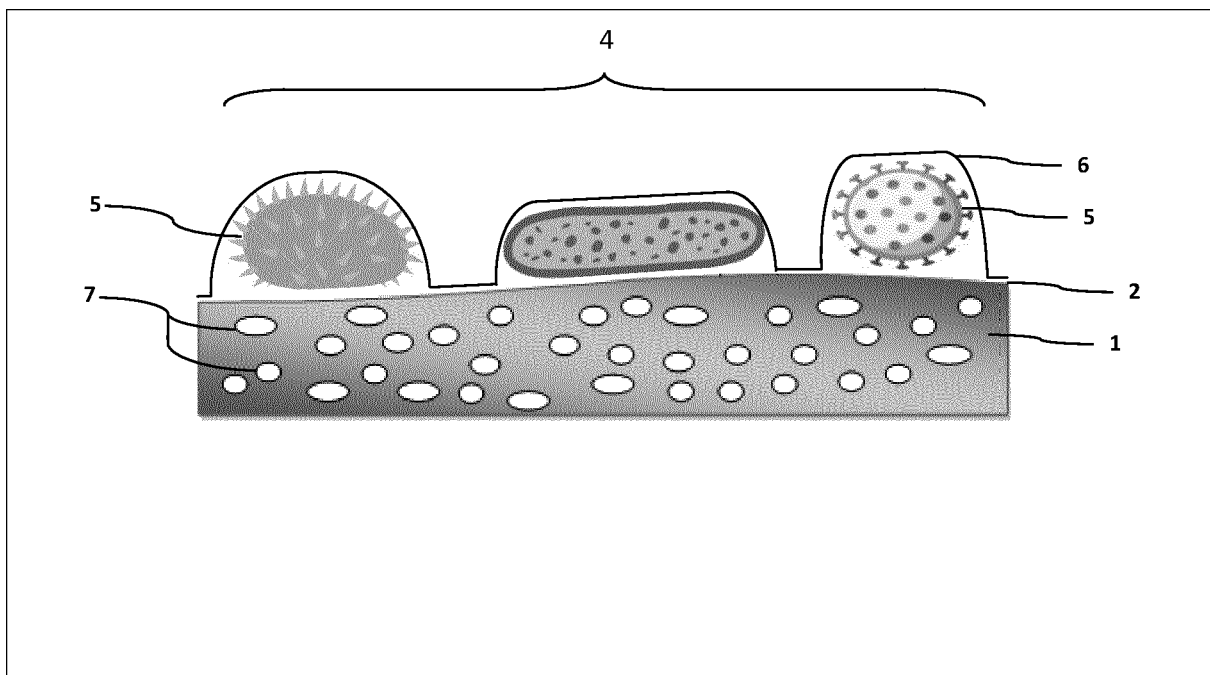


FIGURE 2

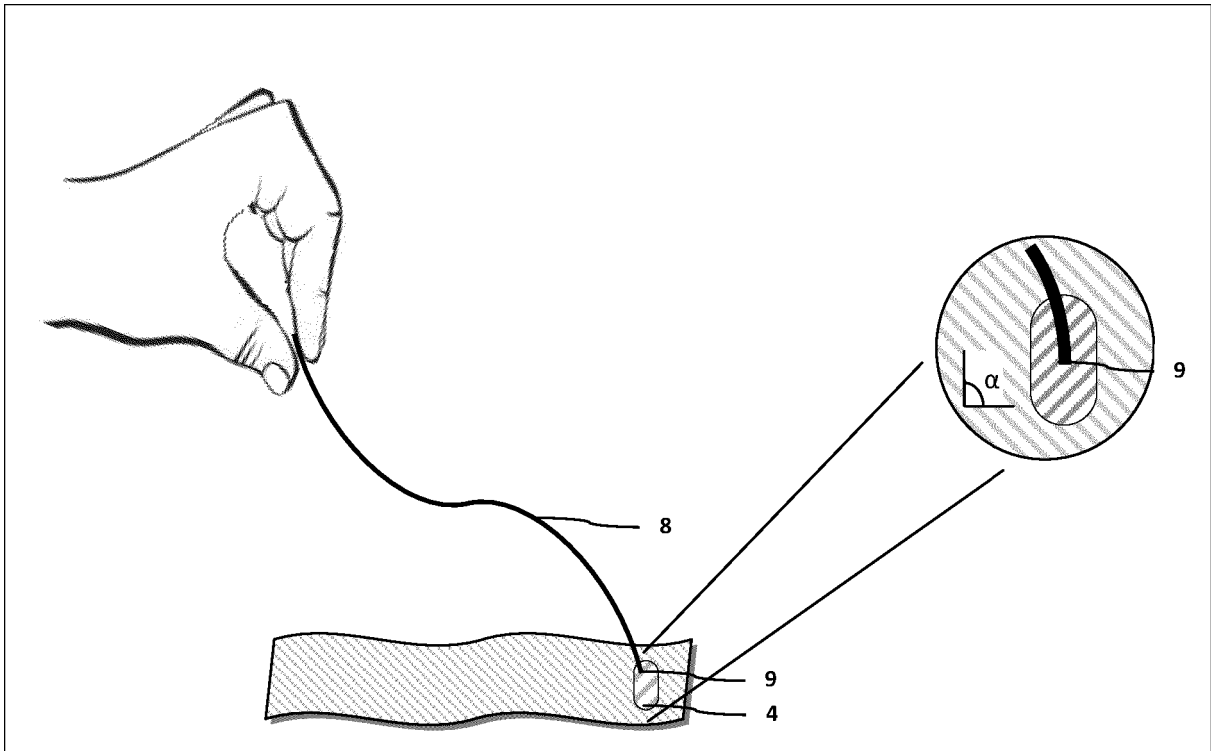


FIGURE 3

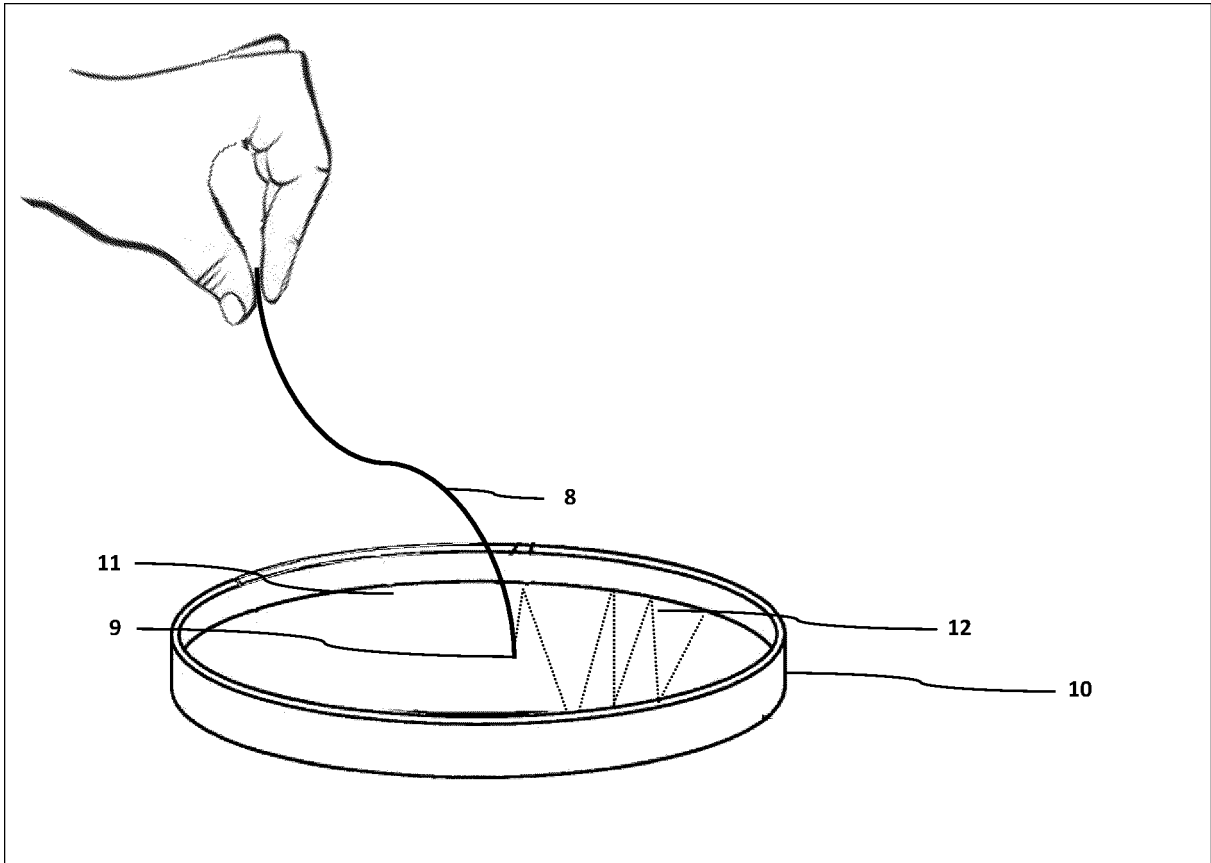


FIGURE 4

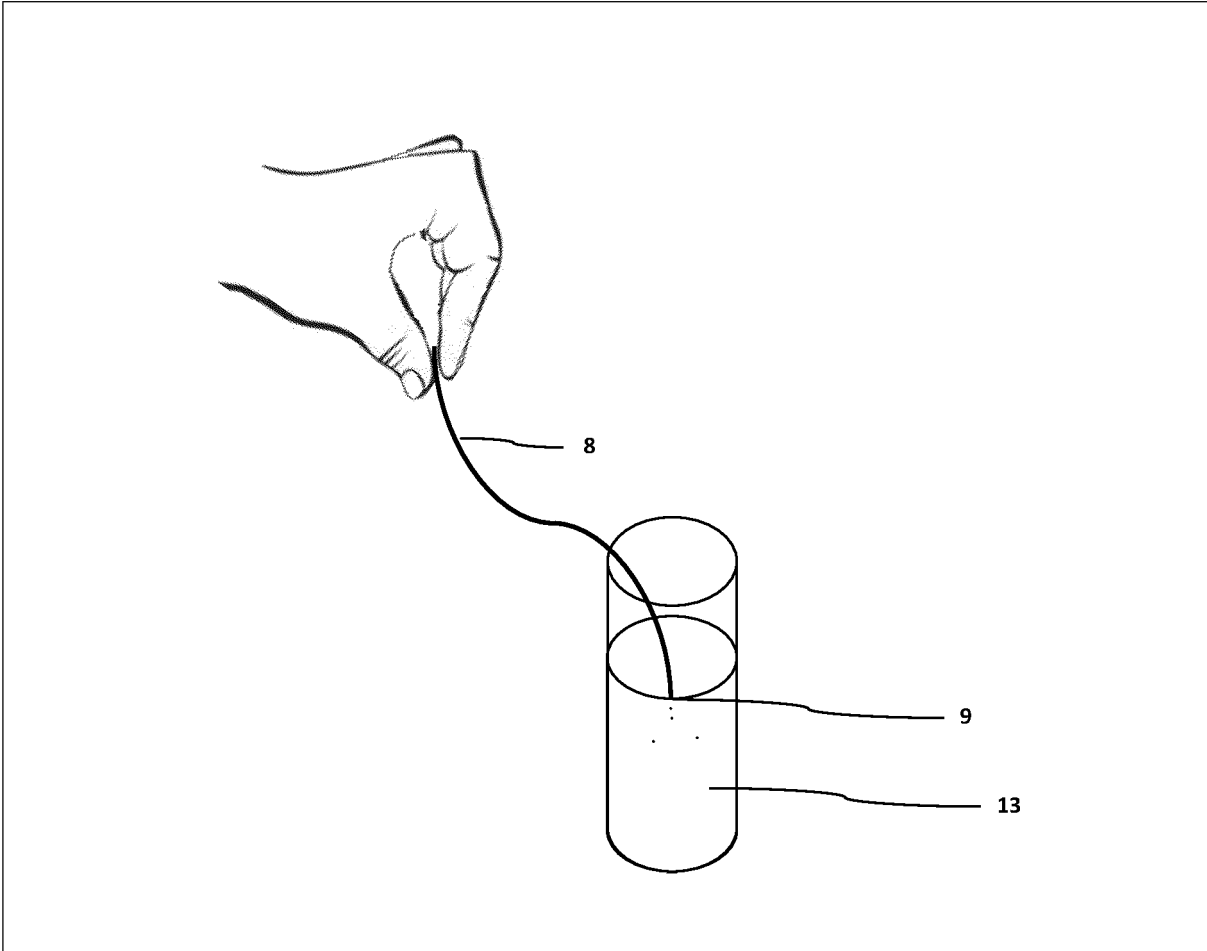


FIGURE 5



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 859437
FR 1859274

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		
A	Anonymous: "My Test Colorectal (notice d'utilisation)", 15 mai 2017 (2017-05-15), XP055599028, Extrait de l'Internet: URL:http://www.gamme-mylanmytest.fr/media/mytest-colorectal-notice-300040f_ifu_05_1307161050.pdf [extrait le 2019-06-24] * le document en entier * * figures A-B *	1-14	C12Q1/24 G01N1/38 C12Q1/02
A	JP H02 31671 A (TANAKA PRECIOUS METAL IND) 1 février 1990 (1990-02-01) * le document en entier * * abrégé * * exemple 1 (traduit) *	1-14	
A	FR 2 985 519 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]) 12 juillet 2013 (2013-07-12) * le document en entier * * abrégé * * page 5, ligne 29 - page 6, ligne 3 * * exemples 1-2 * * revendications 1, 10 *	1-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12Q C12M G01N
A	WO 2015/104501 A1 (BIOMÉRIEUX [FR]) 16 juillet 2015 (2015-07-16) * le document en entier * * abrégé * * revendications 1, 4 *	1-14	
A	FR 2 530 814 A1 (ASTEC [FR]) 27 janvier 1984 (1984-01-27) * le document en entier * * abrégé * * revendication 1 *	1-14	
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
24 juin 2019		Gall-Truchot, A	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		
		& : membre de la même famille, document correspondant	

2
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1859274 FA 859437**

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 **24-06-2019**

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
JP H0231671	A	01-02-1990	AUCUN	

FR 2985519	A1	12-07-2013	CN 104115010 A	22-10-2014
			EP 2802875 A1	19-11-2014
			FR 2985519 A1	12-07-2013
			JP 2015504163 A	05-02-2015
			US 2014349280 A1	27-11-2014
			WO 2013104864 A1	18-07-2013

WO 2015104501	A1	16-07-2015	CN 105899653 A	24-08-2016
			EP 3092297 A1	16-11-2016
			FR 3016169 A1	10-07-2015
			US 2016326564 A1	10-11-2016
			WO 2015104501 A1	16-07-2015

FR 2530814	A1	27-01-1984	AUCUN	

FR 2751342	A1	23-01-1998	AUCUN	
