(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
30 octobre 2014 (30.10.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/174203 A1

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 1/40 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2014/050973

(22) Date de dépôt international :
22 avril 2014 (22.04.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1353755 24 avril 2013 (24.04.2013) FR
1359952 14 octobre 2013 (14.10.2013) FR

(71) Déposant : **BIOMÉRIEUX** [FR/FR]; F-69280 Marcy l'Etoile (FR).

(72) Inventeurs : **BROYER, Patrick**; Le Deamy, 44 chemin de la Martelière, F-38500 Saint Cassien (FR). **VERON, Laurent**; 8 avenue Piaton, F-69100 Villeurbanne (FR). **ROSTAING, Hervé**; 6, cité du Pruney II, F-38420 Le Versoud (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))*

(54) **Title** : DEVICE FOR PREPARING BIOLOGICAL SAMPLES

(54) **Titre** : DISPOSITIF POUR LA PREPARATION D'ECHANTILLON BIOLOGIQUE

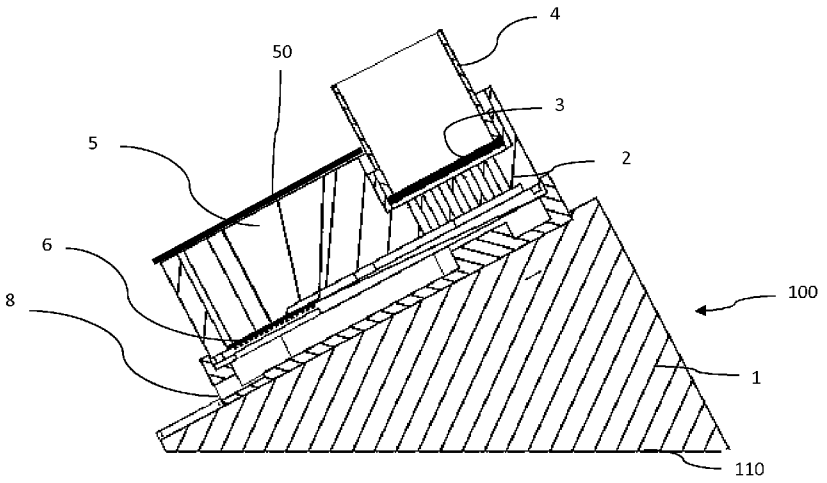


FIG. 2

(57) **Abstract** : A device for preparing biological samples comprising a fixed support of which the base extends in a first plane, a filtration block that can be removable, said filtration block comprising a collecting tank that itself comprises a filtering means extending in a second plane and dividing said collecting tank into a collection area and a suction area, the suction area being designed to be connected to a suction means, the second plane of the filtering means being inclined relative to the plane of the base of the fixed support.

(57) **Abrégé** : Dispositif pour la préparation d'échantillon biologique comprenant un support fixe dont la base s'étend selon un premier plan, un bloc de filtration pouvant être amovible, ledit bloc de filtration comprenant un réservoir

[Suite sur la page suivante]

WO 2014/174203 A1

de collecte comportant lui-même un moyen de filtration s'étendant selon un second plan et divisant ledit réservoir de collecte en une zone de collecte et une zone d'aspiration, la zone d'aspiration étant adaptée pour être connectée à un moyen d'aspiration, le second plan du moyen de filtration étant incliné par rapport au plan de la base du support fixe.

DISPOSITIF POUR LA PREPARATION D'ECHANTILLON BIOLOGIQUE

Le domaine de la présente invention est celui de l'analyse microbiologique. Plus particulièrement, la présente invention concerne un dispositif pour la préparation d'échantillon biologique en vue d'un diagnostic microbiologique.

La filtration sous vide est utilisée de manière classique dans les laboratoires. Elle est utilisée de deux manières :

- soit pour clarifier un échantillon. Le filtrat est alors gardé et le filtre jeté,
- soit pour collecter et concentrer des particules ou microorganismes d'intérêt présents dans un échantillon liquide. Dans ce second cas, le filtrat est jeté, le concentrât (également appelé retentât) et/ou le filtre sont conservés.

Un dispositif connu de l'état de l'art est l'entonnoir Büchner. Un tel dispositif est représenté sur la figure 1. Il comprend un entonnoir dans lequel est disposée transversalement une plaque perforée. L'entonnoir est emmanché de manière étanche dans le goulot d'une fiole à vide à l'aide d'un bouchon. La fiole à vide est connectée à une source d'aspiration. Sur la plaque perforée est disposé un papier filtre humidifié de sorte que des particules présentes dans un liquide versé sur la partie supérieure du papier puissent être retenues lors de l'aspiration. Le liquide filtré, ou filtrat, est collecté dans la fiole.

Un tel dispositif présente plusieurs inconvénients. En effet, le filtre peut se boucher rapidement si le liquide contient trop de particules ou microorganismes ce qui peut empêcher la filtration de la totalité du volume. D'autre part, la grande surface de filtration, nécessaire pour pouvoir filtrer une quantité suffisante d'échantillon, peut nécessiter d'employer un volume important de liquide pour la remise en suspension complète des micro-organismes retenus sur le filtre, ce qui ne permet pas d'avoir un rapport de concentration optimal.

Après avoir filtré l'échantillon grâce à ce dispositif, la collecte de particules d'intérêt ou microorganismes retenus sur le papier filtre est difficile et nécessite d'utiliser un écouvillon de manière manuelle. La récupération par écouvillon de manière automatique n'est pas évidente à réaliser de manière reproductible. De plus ce type de dispositif présente un deuxième rendement de relargage défavorable si le concentrât, notamment bactérien, doit être délivré sous forme liquide pour les besoins du protocole d'analyse. Enfin, lors des étapes de lavages du filtre ou de reprise des microorganismes avec une pipette, le liquide dispensé s'étale sur toute la surface du filtre, il est donc difficile de l'aspirer de nouveau. De ce fait, la séquence d'un protocole de filtration à l'aide de ce dispositif ne peut être automatisée facilement.

Un autre dispositif de l'art antérieur, décrit dans la demande de brevet US 2007/0298451 A1, comprend un bloc de filtration inférieur et un bloc de filtration supérieur. Le bloc de filtration supérieur comprend une paroi cylindrique d'un premier diamètre et une paroi cylindrique d'un diamètre inférieur reliée par une partie transversale. Sur la partie transversale est disposée une plaque perforée ainsi qu'une membrane de filtration. Le bloc de filtration inférieur comprend une paroi cylindrique d'un premier diamètre et une paroi cylindrique d'un diamètre inférieur reliée par une partie transversale. Sur la partie transversale est disposée une plaque perforée ainsi qu'une membrane de filtration. Une paroi cylindrique d'un diamètre encore inférieur est disposée en aval de la plaque perforée et reliée au bloc de filtration inférieur par une partie transversale, de manière à connecter une source d'aspiration au dispositif.

Le bloc de filtration supérieur est emmanché sur le bloc de filtration inférieur. La membrane du bloc de filtration supérieur a une porosité supérieure à la membrane du bloc de filtration inférieur. De ce fait, en déversant un échantillon liquide sur la membrane du bloc de filtration supérieur et en activant la source d'aspiration, celui-ci est filtré une première puis une seconde fois.

Bien que ce dispositif puisse présenter un meilleur rendement de filtration, notamment en effectuant des filtrations progressives, le liquide dispensé s'étale également sur toute la surface des deux membranes, rendant la collecte difficile. De plus, un bouchage, même partiel, d'une ou des membrane(s) peut entrainer une perte de charge lors de l'aspiration et ralentir voire empêcher la filtration.

Le but de l'invention est donc de remédier aux inconvénients de l'art antérieur précité.

Un premier objectif de la présente invention est ainsi de fournir un dispositif de traitement d'échantillon biologique permettant de collecter les microorganismes contenus dans l'échantillon en éliminant des constituants de la matrice de ce dernier. De tels constituants pouvant être des sels dissouts, protéines, cristaux, mucus, cellules humaines, ou autres.

Un deuxième objectif de l'invention est de fournir un dispositif de traitement d'échantillon biologique permettant la purification rapide d'un contenu microbien pour analyse ultérieure ainsi que le lavage du filtre ou de la membrane de collecte.

Un troisième objectif de l'invention est de fournir un dispositif de traitement d'échantillon biologique permettant à la fois de concentrer des microorganismes à la surface du filtre ou de la membrane de collecte et de remettre en suspension les microorganismes ainsi concentrés, dans un volume de tampon limité.

Un quatrième objectif de l'invention est de fournir un dispositif de traitement d'échantillon biologique de sorte que les étapes du protocole de traitement utilisant le dispositif puissent être réalisées de façon totalement automatisées par un robot de pipetage approprié (e.g. Starlet d'Hamilton Robotics), également appelé robot pipeteur.

Ces objectifs parmi d'autres, sont atteints par la présente invention qui concerne en premier lieu un dispositif pour la préparation d'échantillon biologique comprenant :

- un support fixe dont la base s'étend selon un premier plan,
- un bloc de filtration pouvant être amovible, ledit bloc de filtration comprenant un réservoir de collecte comprenant lui-même une paroi et un moyen de filtration, le moyen de filtration s'étendant selon un second plan et divisant ledit réservoir de collecte en une zone de collecte et une zone d'aspiration, la zone d'aspiration étant adaptée pour être connectée à un moyen d'aspiration, le second plan du moyen de filtration étant incliné par rapport au plan de la base du support fixe.

Alternativement, la présente invention concerne un dispositif pour la préparation d'échantillon biologique comprenant :

- un support fixe dont la base s'étend selon un premier plan,
- un bloc de filtration pouvant être amovible, ledit bloc de filtration comprenant un réservoir de collecte comportant lui-même un moyen de filtration s'étendant selon un second plan et divisant ledit réservoir de collecte en une zone de collecte et une zone d'aspiration, la zone d'aspiration étant adaptée pour être connectée à un moyen d'aspiration, le second plan du moyen de filtration étant incliné par rapport au plan de la base du support fixe.

Par échantillon biologique, on entend un échantillon liquide, susceptible de contenir un ou plusieurs constituants d'intérêt, tel que des urines, des hémocultures, du crachat, du liquide céphalo rachidien,…. Ces constituants d'intérêt peuvent être des microorganismes tel que des levures, des bactéries, ou encore des micro-vésicules ou des exosomes.

Alternativement, l'invention a pour objet un dispositif pour la préparation d'échantillon biologique comprenant :

- un support fixe dont la base s'étend selon un premier plan,
- un bloc de filtration pouvant être amovible,

ledit bloc de filtration comprenant un réservoir de collecte comportant lui-même un moyen de filtration s'étendant selon un second plan et divisant ledit réservoir de collecte en une zone de collecte et une zone d'aspiration, la zone d'aspiration étant adaptée pour être connectée à un moyen d'aspiration, le second plan du moyen de filtration étant incliné par rapport au plan de la base du support fixe, le bloc de filtration comporte en outre un réservoir de préfiltration pouvant être amovible, ledit réservoir de préfiltration comprenant un moyen de filtration divisant le réservoir de préfiltration en une zone de collecte et une zone d'aspiration, la zone d'aspiration du réservoir de préfiltration étant en communication fluidique avec la zone de collecte du réservoir de collecte.

Alternativement, l'invention a pour objet un dispositif pour la préparation d'échantillon biologique comprenant :

- un support fixe dont la base s'étend selon un premier plan,
- un bloc de filtration pouvant être amovible,

ledit bloc de filtration comprenant un réservoir de collecte comprenant lui-même une paroi et un moyen de filtration, le moyen de filtration s'étendant selon un second plan et divisant ledit réservoir de collecte en une zone de collecte et une zone d'aspiration, la zone d'aspiration étant adaptée pour être connectée à un moyen d'aspiration, le second plan du moyen de filtration étant incliné par rapport au plan de la base du support fixe, le bloc de filtration comporte en outre un réservoir de préfiltration pouvant être amovible, ledit réservoir de préfiltration comprenant un moyen de filtration divisant le réservoir de préfiltration en une zone de collecte et une zone d'aspiration, la zone d'aspiration du réservoir de préfiltration étant en communication fluidique avec la zone de collecte du réservoir de collecte.

Alternativement, la zone d'aspiration du réservoir de préfiltration est adaptée pour être connectée à un second moyen d'aspiration.

De manière avantageuse, la paroi du réservoir de collecte dans la zone de collecte est en partie inclinée ou en forme d'ogive.

De manière avantageuse, la paroi de la zone de collecte du réservoir de collecte est en partie inclinée ou en forme d'ogive.

De manière avantageuse, la paroi du réservoir de collecte dans la zone de collecte est rigide.

De manière avantageuse, le moyen de filtration du réservoir de collecte comprend au moins une membrane de porosité comprise entre 0,02 et 1,5µm, préférentiellement entre 0,02 et 1µm, plus préférentiellement entre 0,02 et 0,8µm, encore plus préférentiellement entre 0,02 µm et 0,45 µm

De manière avantageuse, le moyen de filtration du réservoir de collecte comprend au moins une membrane de porosité comprise entre 0,02 µm et 0,45 µm.

De manière avantageuse, le moyen de filtration du réservoir de préfiltration comprend au moins un filtre de porosité comprise entre 5 µm et 1000 µm, préférentiellement entre 5 µm et 100 µm.

Alternativement, le moyen de filtration du réservoir de préfiltration comprend un empilement de filtres.

Alternativement, le moyen de filtration du réservoir de préfiltration comprend un empilement de filtres de porosité croissante de la zone d'aspiration du réservoir de préfiltration vers la zone de collecte du réservoir de préfiltration. Dans ce but, le moyen de filtration du réservoir de préfiltration comprend ou est constitué d'un empilement de préfiltres de porosité croissante dans l'ordre allant du bas vers le haut, le préfiltre placé en haut étant le premier à recevoir le liquide.

De manière avantageuse, le second plan du moyen de filtration du réservoir de collecte est incliné par rapport au plan de la base du support fixe d'un angle compris entre 10° et 60°, de préférence compris entre 20° et 50°, de préférence compris entre 25° et 45°, plus préférentiellement égal à 30°.

Alternativement, le réservoir de collecte comprend une partie supérieure et une partie inférieure coopérant pour maintenir le moyen de filtration du réservoir de collecte

Alternativement, le réservoir de préfiltration comprend une partie supérieure et une partie inférieure coopérant pour maintenir le moyen de filtration du réservoir de préfiltration

Alternativement, le réservoir de préfiltration comprend un moyen susceptible de coopérer avec un outil pour robot pipeteur tel qu'un porte pipette ou un porte écouvillon.

Alternativement le bloc de filtration comporte en outre un troisième réservoir de filtration pouvant être amovible, ledit troisième réservoir de filtration comprenant un moyen de filtration divisant le troisième réservoir de filtration en une zone de collecte et une zone d'aspiration, la zone de collecte du troisième réservoir de filtration étant en communication fluidique avec la zone d'aspiration du réservoir de collecte.

De manière avantageuse, le moyen d'aspiration est un moyen d'aspiration / refoulement.

Par moyen d'aspiration/refoulement, on entend tout moyen susceptible de faire franchir un liquide de la zone de collecte du réservoir de collecte vers la zone d'aspiration du réservoir de collecte par aspiration et éventuellement de la zone d'aspiration du réservoir de collecte vers la zone de collecte du réservoir de collecte par refoulement. L'intérêt du refoulement est notamment de pouvoir remettre en suspension dans un liquide une partie du concentrât de constituants d'intérêts (également appelé retentât) issu de l'échantillon biologique en la décollant du moyen de filtration. Une succession d'étapes d'aspiration et de refoulement permet également d'améliorer la concentration du concentrât dans la zone de collecte, plus particulièrement dans une zone préférentielle. Cette opération d'aspiration / refoulement peut donc être réalisée à plusieurs reprises. Cette opération d'aspiration / refoulement peut être réalisé en ajoutant un tampon, par exemple un tampon carbonate ou de l'eau, notamment pour effectuer un lavage.

De manière avantageuse, le second moyen d'aspiration pouvant être connecté à la zone d'aspiration du réservoir de préfiltration est un moyen d'aspiration / refoulement.

De manière avantageuse, le moyen d'aspiration est remplacé par un moyen de mise en surpression du réservoir de collecte et/ou du réservoir de préfiltration et/ou du réservoir de filtration. Le moyen de mise en surpression est pour cela adapté pour être connecté à la zone de collecte du réservoir de collecte et/ou du réservoir de préfiltration et/ou du réservoir de filtration. De manière avantageuse, le second moyen d'aspiration est remplacé par un second moyen de mise en surpression du réservoir de collecte et/ou du réservoir de préfiltration. Le second moyen de mise en surpression est pour cela adapté pour être connecté à la zone de collecte du réservoir de collecte et/ou du réservoir de préfiltration.

De manière avantageuse, le réservoir de collecte et/ou le réservoir de préfiltration et/ou le réservoir de filtration est obturé par un moyen d'obturation. De manière encore plus avantageuse, ledit moyen d'obturation est perçable par un outil pour robot pipeteur, tel qu'une

pipette, un écouvillon, un porte pipette, un porte écouvillon, un outil de préhension tel qu'une pince ou directement par l'embout d'un canal de pipetage intégré dans le robot.

De manière alternative, ledit moyen d'obturation est retirable par un outil pour robot pipeteur, par exemple un outil de préhension tel qu'une pince, un porte pipette ou un porte écouvillon.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un dispositif selon l'un quelconque des différents modes de réalisations présentés pour le traitement d'un échantillon biologique.

L'invention a également pour objet un procédé de traitement d'un échantillon biologique à l'aide d'un dispositif selon l'un quelconque des différents modes de réalisations présentés comprenant les étapes suivantes:

- déposer l'échantillon biologique sur le moyen de filtration du réservoir de collecte
- aspirer l'échantillon biologique au travers du moyen de filtration du réservoir de collecte, à l'aide du moyen d'aspiration connecté à la zone d'aspiration du réservoir de collecte
- collecter les microorganismes sur le moyen de filtration du réservoir de collecte

Alternativement, l'invention a pour objet un procédé de traitement d'un échantillon biologique à l'aide d'un dispositif selon l'invention comprenant les étapes suivantes:

- déposer l'échantillon biologique sur le moyen de filtration du réservoir de préfiltration,
- aspirer l'échantillon biologique au travers du moyen de filtration du réservoir de préfiltration de manière à déposer l'échantillon biologique sur le moyen de filtration du réservoir de collecte à l'aide du moyen d'aspiration connecté à la zone d'aspiration du réservoir de collecte,
- aspirer l'échantillon biologique au travers du moyen de filtration du réservoir de collecte à l'aide du moyen d'aspiration connecté à la zone d'aspiration du réservoir de collecte,
- collecter les microorganismes sur le moyen de filtration du réservoir de collecte.

Alternativement, l'invention a pour objet un procédé de traitement d'un échantillon biologique à l'aide d'un dispositif selon l'invention comprenant les étapes suivantes: .

- déposer l'échantillon biologique sur le moyen de filtration du réservoir de préfiltration,

- aspirer l'échantillon biologique au travers du moyen de filtration du réservoir de préfiltration de manière à déposer l'échantillon biologique sur le moyen de filtration du réservoir de collecte à l'aide du second moyen d'aspiration connecté à la zone d'aspiration du réservoir de préfiltration,
- aspirer l'échantillon biologique au travers du moyen de filtration du réservoir de collecte à l'aide du moyen d'aspiration connecté à la zone d'aspiration du réservoir de collecte,
- collecter les microorganismes sur le moyen de filtration du réservoir de collecte.

Alternativement, l'invention a pour objet un procédé de traitement d'un échantillon biologique à l'aide d'un dispositif selon l'invention tel que décrit ci-dessus, comprenant en outre une étape consistant à :

- refouler l'échantillon biologique au travers du moyen de filtration du réservoir de collecte à l'aide du moyen d'aspiration/refoulement connecté à la zone d'aspiration du réservoir de collecte,

Alternativement, l'invention a pour objet un procédé de traitement d'un échantillon biologique à l'aide d'un dispositif selon l'invention tel que décrit ci-dessus, dont l'étape consistant à :

- collecter les microorganismes sur le moyen de filtration du réservoir de collecte.

et remplacée par une étape consistant à :

- collecter les microorganismes sur le moyen de filtration du réservoir de collecte dans une zone préférentielle de collecte.

Le dispositif inventé permet un accès aisé au moyen de filtration du réservoir de collecte, par exemple à la membrane, afin de pouvoir exécuter des lavages ou collecter les microorganismes, par exemple par remise en suspension à la pipette ou par écouvillonnage.

L'inclinaison du second plan dans lequel s'étend le moyen de filtration du réservoir de collecte par rapport au plan de la base du support fixe peut être obtenue par la géométrie du support fixe sur lequel est disposé le bloc de filtration et/ou par inclinaison du moyen de filtration. A titre d'exemple, le support fixe peut comprendre un plan incliné par rapport à sa base, celle-ci étant à l'horizontale, le bloc de filtration étant disposé sur ce plan incliné et le moyen de filtration du réservoir de collecte s'étendant selon un plan parallèle à ce plan incliné.

Grâce à cette inclinaison, lorsque le liquide est dispensé, en provenance du moyen de filtration du réservoir de préfiltration et/ou directement sur le moyen de filtration et/ou par aspiration/refoulement, il coule naturellement sur le moyen de filtration, où il peut éventuellement être de nouveau aspiré, dans une zone préférentielle de collecte.

L'inclinaison du second plan dans lequel s'étend le moyen de filtration du réservoir de collecte par rapport au plan de la base du support fixe est fixe durant toute l'étape de filtration.

La forme de la paroi du réservoir de collecte permet, en coopération avec l'inclinaison du second plan dans lequel s'étend le moyen de filtration, de favoriser la rétention de l'échantillon biologique dans une zone préférentielle de collecte lorsque celui-ci est dispensé dans le réservoir de collecte. Cette zone préférentielle correspondant à la partie basse du moyen de filtration. Cette zone préférentielle contient à la suite d'une étape de filtration, la majorité du concentrât de microorganismes ou de constituants d'intérêt présents dans l'échantillon biologique. La zone d'aspiration est donc définie par le second plan du moyen de filtration est la paroi du réservoir de collecte de telle sorte que le moyen de filtration est la paroi du réservoir de collecte sont en contact dans la zone préférentielle. L'intérêt de ce contact est d'éviter la formation de volumes morts où une partie liquide de l'échantillon biologique pourrait stagner après l'étape de filtration. Un autre intérêt de ce contact et de cette zone préférentielle est de favoriser la rétention de l'échantillon biologique dans une zone délimitée et prédictible, ce qui favorise un rendement plus élevé de récupération par un automate robot pipeteur ne disposant pas de système de vision, notamment de système de vision destiné à localiser un tapis bactérien sur la surface du moyen de filtration. La géométrie de cette zone préférentielle peut être modifiée selon l'angle formé entre le moyen de filtration et la paroi du réservoir de collecte. Cet angle peut être fermé (aigu) pour créer une zone préférentielle localisée mais profonde ou ouvert (obtus) pour limiter la profondeur de la zone préférentielle tout en agrandissant la surface recouverte par ladite zone pour un même volume de liquide contenu dans cette zone. L'angle formé entre le moyen de filtration et la paroi du réservoir de collecte dans la zone préférentielle est ainsi compris entre 10 et 170 degrés, préférentiellement entre 30 et 150 degrés, préférentiellement entre 50 et 130 degrés, préférentiellement entre 70 et 120 degrés, plus préférentiellement entre 80 et 100 degrés, plus préférentiellement entre 50 et 70 degrés. Encore plus préférentiellement l'angle est de 90 degrés. Encore plus préférentiellement l'angle est de 60 degrés.

Préférentiellement, le moyen de filtration est la paroi du réservoir de collecte sont en contact sur toute la surface du moyen de filtration. L'intérêt de ce contact sur toute la surface du moyen de filtration est de limiter l'adhérence sur la paroi de débris éventuels contenus dans l'échantillon biologique et de simplifier le processus la filtration de l'échantillon biologique, celui-ci pouvant

être distribué n'importe où dans la zone de collecte du réservoir de collecte, notamment sur la paroi où directement sur le moyen de filtration.

Au fur et à mesure de la délivrance des jets de tampon de collecte, les microorganismes se concentrent vers la partie basse du moyen de filtration formant par exemple un angle fermé avec la paroi du réservoir de collecte. Un concentrât bactérien peut par exemple être récupéré sans perte significative de volume (volume récupéré de 300 à 700 µL), par rapport au volume de tampon de collecte dispensé (volume 400 à 1000 µL), soit un facteur 10 à 20 par rapport au volume initial d'échantillon biologique. L'inclinaison du second plan du moyen de filtration par rapport au plan de la base du support fixe peut être comprise entre 10° et 60°, de préférence comprise entre 20° et 50°, de préférence comprise entre 25° et 45°, plus préférentiellement égale à 30°.

Le dispositif selon l'invention est facilement utilisable avec un pipeteur automatisé également appelé robot pipeteur. Dans ce but, la paroi du réservoir de collecte est adaptée pour pouvoir présenter verticalement un outil pour robot pipeteur, tel qu'une pipette ou un écouvillon, en aplomb de toute la surface du moyen de filtration du réservoir de collecte directement après ou pendant l'étape de filtration. L'intérêt est de ne pas avoir à déplacer le dispositif, le réservoir de collecte et/ou le moyen de filtration pour collecter le concentrât de constituants d'intérêts. Un autre intérêt est de pouvoir collecter par abrasion ou décollement le concentrât de constituants d'intérêts, tel que des microorganismes, déposé sur tout ou partie du moyen de filtration après filtration, au moyen d'un écouvillon. Cette géométrie facilite également les opérations de pipetage et/ou d'écouvillonnage, manuelles et/ou automatiques, notamment directement après ou pendant l'étape de filtration. Ainsi, la forme de la paroi du réservoir de collecte est adaptée pour qu'un opérateur ou un robot pipeteur puisse accéder à toute la surface du moyen de filtration du réservoir de collecte, notamment à la verticale dudit moyen de filtration. Un robot pipeteur présente en effet une pipette se déplaçant en translation selon trois degrés de liberté et ne permettant pas de réaliser des mouvements complexes ni de présenter une pipette autrement qu'à la verticale.

Cet accès à toute la surface du moyen de filtration du réservoir de collecte permet ainsi de dispenser un liquide sur une zone du moyen de filtration du réservoir de collecte d'un jet puissant puis d'aspirer ce même liquide afin de pouvoir le re-dispenser puissamment sur une autre zone du moyen de filtration du réservoir de collecte. Une série d'une vingtaine de dispense/ré-aspirations peut ainsi être effectuée afin de concentrer puis récolter les constituants d'intérêts retenus sur toute la surface du moyen de filtration du réservoir de collecte. L'inclinaison du réservoir de collecte permet de plus au liquide de collecte de se localiser dans

la zone préférentielle de collecte en limitant les pertes de volume qu'engendrerait un système de filtration horizontal.

De manière avantageuse, la paroi du réservoir de collecte peut présenter au moins une partie inclinée, ou en forme d'ogive, adaptée pour pouvoir présenter verticalement une pipette, en aplomb du concentrât de constituants d'intérêts, notamment de microorganismes, le concentrât étant majoritairement localisé dans la zone préférentielle. Cette géométrie facilite également les opérations de pipetage et/ou d'écouvillonnage, manuelles et/ou automatiques, notamment en évitant de venir heurter la paroi du réservoir de collecte.

L'intérêt d'un tel dispositif est de pouvoir être utilisé, sur un même type de dispositif, pour différents types d'échantillons biologiques (urines, hémocultures,....) de volumes différents (10 mL à 1 mL), en sélectionnant un protocole de traitement adapté à l'échantillon biologique considéré. Ainsi, pour les hémocultures, le protocole est une lyse sélective suivie d'une unique filtration sur un moyen de filtration, par exemple une membrane. Pour des urines cliniques, le protocole consiste en une préfiltration sur le moyen de filtration du réservoir de préfiltration, suivie d'une filtration sur le moyen de filtration du réservoir de collecte, par exemple sur une membrane. Les deux protocoles peuvent avantageusement être suivis d'une ou plusieurs étapes de lavage du concentrât bactérien, à l'aide de solutions de lavage adaptées.

Par ailleurs, pour une approche d'Identification Typage Résistance Virulence (ITRV) de microorganismes, tel que des bactéries, par une technologie de spectrométrie de masse par Ionisation ElectroSpray (ESI), disposer des microorganismes en suspension liquide est plus pratique pour la suite du protocole (lyse suivie d'une extraction des protéines ou lyse suivie d'une digestion trypsique des protéines).

L'intérêt d'un tel dispositif est également de pouvoir être jetable. Les matériaux utilisés pour sa réalisation étant peu coûteux, le dispositif et/ou le bloc de filtration et/ou le réservoir de préfiltration peuvent être à usage unique pour le traitement d'un échantillon. De manière encore plus avantageuse, le bloc de filtration est amovible. De manière encore plus avantageuse, le bloc de filtration est amovible et à usage unique.

Le réservoir de préfiltration peut également être amovible. De manière avantageuse, le réservoir de préfiltration est amovible et à usage unique.

Le dispositif peut également être utilisé en vue de la préparation automatique de plaques MALDI-TOF après extraction des microorganismes à partir des échantillons biologiques. Les microorganismes pouvant par exemple être collectés directement sur le moyen de filtration du

réservoir de collecte par un outil robotisé pour être déposés sur une plaque MALDI-TOF ou servir à la préparation d'une suspension de microorganismes concentrée et calibrée. De la même manière, les microorganismes peuvent être disposés dans une suspension liquide qui sera centrifugée afin de pouvoir récupérer un culot de microorganismes. Ce culot de microorganismes sera alors déposé sur une plaque MALDI-TOF.

Les buts et avantages du dispositif selon la présente invention seront mieux compris à la lumière des exemples nullement limitatifs qui suivent, en référence au dessin, dans lequel :

La figure 1 est un dispositif de l'art antérieur

La figure 2 est une représentation schématique en coupe d'un premier mode de réalisation du dispositif selon l'invention comprenant un bloc de filtration sur un support fixe incliné à 30°.

La figure 3 est une représentation schématique en coupe du bloc de filtration, selon le premier mode de réalisation.

La figure 4 est une représentation schématique en perspective du premier mode de réalisation du dispositif selon l'invention.

La figure 5 est une représentation schématique en vue de dessous du bloc de filtration, selon le premier mode de réalisation.

La figure 6 est une représentation schématique en vue de dessus du bloc de filtration, selon le premier mode de réalisation.

La figure 7 est une représentation schématique en perspective du support fixe incliné à 30°, selon le premier mode de réalisation.

La figure 8 est une photographie du premier mode de réalisation du dispositif selon l'invention.

La figure 9 est une représentation schématique en perspective d'un second mode de réalisation du dispositif comprenant un support à coulisseau.

La figure 10 est une représentation schématique en coupe du second mode de réalisation du dispositif.

La figure 11 est une représentation schématique en coupe du Détail A du second mode de réalisation du dispositif, tel que représenté sur la figure 10.

La figure 12 est une représentation schématique en coupe du Détail B du second mode de réalisation du dispositif, tel que représenté sur la figure 10.

La figure 13 est une représentation schématique en perspective du support de préfiltre du second mode de réalisation du dispositif.

La figure 14 est une représentation schématique en perspective et en coupe du second mode de réalisation du dispositif présentant les flux d'aspiration « A » et « B ».

La figure 15 est une représentation schématique en perspective et en coupe du second mode de réalisation du dispositif sans l'étage de préfiltration présentant le flux d'aspiration « B » dans cette utilisation.

La figure 16 est une représentation schématique en coupe du second mode de réalisation du dispositif sans l'étage de préfiltration, combiné à un dispositif de pipetage.

La figure 17 est un graphe illustrant les taux de préfiltration obtenus en utilisant le dispositif selon l'invention pour le traitement de différents échantillons d'urines inoculées.

La figure 18 comporte trois graphes montrant la détection en ESI-MS de peptides spécifiques de l'espèce inoculée dans des bouteilles d'hémoculture en comparaison avec un contrôle négatif (hémoculture stérile). Cette figure 18 illustre une expérience utilisant le dispositif selon l'invention pour le traitement d'échantillons d'hémocultures inoculées.

Selon un premier mode de réalisation, le réservoir de collecte est accessible sans avoir à retirer le réservoir de préfiltration. Le dispositif selon l'invention peut ainsi être placé dans un robot pipeteur, lequel déversera l'échantillon biologique dans le réservoir de préfiltration si une préfiltration est nécessaire, ou dans le réservoir de collecte si une filtration est suffisante. Un tel dispositif est donc apte à traiter des échantillons biologiques de différentes nature, tel que des urines ou du sang, sans avoir à manipuler le réservoir de préfiltration. Lorsque le réservoir de préfiltration n'est pas retiré du dispositif, la zone d'aspiration du réservoir de préfiltration est en communication fluidique avec la zone de collecte du réservoir de collecte.

En référence aux figures 2 et 3,le dispositif 100 est composé d'un support fixe 1 inclinée à 30° sur lequel est installé un bloc de filtration 2 pouvant être amovible. Le bloc de filtration 2 comprend un moyen de filtration également appelé préfiltre ou un empilement de préfiltres 3 contenu dans un réservoir de préfiltration 4 et qui permet de clarifier les solutions à filtrer sans retenir les microorganismes. Le bloc de filtration comprend également un réservoir de collecte 5 avec un moyen de filtration, par exemple une membrane 6 disposée dans le fond du réservoir. Alternativement, l'angle de 30° entre le plan selon lequel s'étend le moyen de filtration du réservoir de collecte et le plan de la base 110 du support fixe 1 est obtenu par une inclinaison du support fixe 1 et/ou du bloc de filtration 2 et/ou de la membrane 6. Alternativement, le réservoir de collecte 5 présente au moins une paroi dont au moins une partie est inclinée 11. Le réservoir de collecte 5 est obturé par un moyen d'obturation. Ce moyen d'obturation est par exemple constitué par un film d'operculage 50, tel que représenté sur la figure 2. Ce film d'operculage permet de maintenir un état dépressionnaire en aval du ou des préfiltre(s) lors de l'opération de filtration de milieux complexes tels que l'urine. Le film d'operculage 50 peut être un film autocollant notamment de type polypropylène bi-axial orienté (BOPP), polytéréphtalate d'éthylène (PET), polyester (PE), aluminium/PE. Un tel film autocollant peut être décollé

aisément par un opérateur ou par le biais d'un automate. Alternativement, le film peut être soudé sur le bloc de filtration 2, par tout moyen approprié (soudure ultrasons, thermoscellage, ...). Un tel film est alors percé pour un outil approprié, pouvant coopérer avec le porte-outil d'un automate. De manière avantageuse un outil approprié est un outil pour robot pipeteur, tel qu'un porte pipete, un porte écouvillon, un outil de préhension tel qu'une pince ou directement par l'embout d'un canal de pipetage intégré dans le robot.

De manière avantageuse, le dispositif et/ou le bloc de filtration et/ou le réservoir de préfiltration peuvent être à usage unique. De manière encore plus avantageuse, le bloc de filtration est amovible. De manière encore plus avantageuse, le bloc de filtration est amovible et à usage unique.

Le réservoir de préfiltration peut également être amovible. De manière avantageuse, le réservoir de préfiltration est amovible et à usage unique.

Selon une alternative, le moyen d'obturation peut être constitué par une pièce de type couvercle en matière plastique comportant un mécanisme d'ouverture adéquat, permettant d'assurer l'étanchéité nécessaire lorsqu'il est positionné sur le réservoir de collecte 5, pour générer l'état dépressionnaire tout en permettant lorsqu'il est relevé de pouvoir accéder au réservoir de collecte.

En référence à la figure 4, le dispositif est relié à un système d'aspiration sous vide (par exemple une pompe), non représenté, et une poubelle qui collecte les liquides filtrés. L'aspiration se fait au travers des orifices d'aspiration du préfiltre 7 et de la membrane 8 situés sur le support fixe 1.

- L'étanchéité entre le bloc de filtration 2 et le support fixe 1 peut être obtenue par tout moyen approprié. Dans le mode de réalisation présenté, le bloc de filtration 2 est vissé sur le support fixe 1 et un joint, non représenté, est placé entre le bloc de filtration 2 et le support fixe 1
- Une vanne, non représentée, permet de gérer le protocole en aspirant soit au niveau du préfiltre 3, soit au niveau de la membrane 6 (soit en aspiration continue en aval de la membrane et en aspiration alternée en aval du préfiltre). La vanne peut être intégrée au système d'aspiration sous vide ou faire partie intégrante du dispositif de filtration.

Tel que représenté sur les figures 5 et 7, le bloc de filtration 2 peut être amovible. Dans ce cas, l'orifice d'aspiration du préfiltre 7 est en communication fluidique avec la zone d'aspiration du réservoir de préfiltration 4 par l'intermédiaire d'un orifice 71 sur le bloc de filtration 2 lorsque

celui-ci est disposé sur le support fixe 1. De même, lorsque le bloc de filtration 2 est disposé sur le support fixe 1, l'orifice d'aspiration 8 de la membrane communique avec la partie débouchante 81 du réservoir de collecte 5 elle-même en communication fluidique avec la zone d'aspiration du réservoir de collecte 5.

En référence à la figure 6, on constate que le réservoir de collecte 5 présente au moins une paroi dont au moins une partie 11 est inclinée.

Afin de réaliser une étape de préfiltration d'un échantillon utilisant le premier mode de réalisation du dispositif selon l'invention et en référence aux figures 4 et 5 , une vanne, non représentée, permet de gérer le protocole en aspirant, soit en aval du préfiltre 3, soit en aval de la membrane (soit en aspiration continue en aval de la membrane et en aspiration alternée en aval du préfiltre).

Le liquide à traiter, par exemple de l'urine, est pipeté dans le réservoir de préfiltration 4 au-dessus du préfiltre 3. La pompe à vide est mise en fonction. La vanne est réglée pour aspirer à travers le préfiltre 3 par l'intermédiaire de l'orifice d'aspiration du préfiltre 7 et, le cas échéant, l'orifice 71. Une fois le liquide préfiltré, celui-ci est dirigé naturellement par la géométrie du dispositif et stocké au-dessus de la membrane de rétention des microorganismes 6. Le liquide préfiltré transite ainsi par un réservoir intermédiaire 9, disposé entre le préfiltre 3 et le réservoir de collecte 5, tel que représenté sur la figure 5.

Afin de réaliser une étape de filtration d'un échantillon sur la membrane 6 et en référence aux figures 4 et 5, la vanne est réglée pour aspirer au niveau de ladite membrane 6 par l'intermédiaire de l'orifice d'aspiration de la membrane 8 et, le cas échéant, la partie débouchante 81 du réservoir de collecte 5. Les microorganismes sont collectés sur cette membrane 6. La porosité de cette membrane est inférieure au diamètre des microorganismes à collecter. Préférentiellement, la porosité est comprise entre 0,22 et 0.45 µm. La membrane peut être lavée afin de purifier les microorganismes. Avantageusement, la paroi du réservoir de collecte 5 comprend au moins une partie inclinée 11 ou au moins une partie en forme d'ogive. Cette forme de la paroi permet, en coopération avec l'inclinaison de la membrane 6 de favoriser la rétention des microorganismes dans un zone préférentielle, correspondant à la partie basse du moyen de filtration 3. Cette partie forme alors un angle aigu entre le moyen de filtration 3 et la paroi du réservoir de collecte 5. Ainsi, dans une étape ultérieure de récupération des microorganismes, une remise en suspension dans un volume réduit de liquide et plus facilement réalisable notamment de manière automatique. L'accessibilité à cette zone est également améliorée. Avantageusement, cette rétention des microorganismes dans une zone préférentielle permet de localiser les microorganismes dans une zone délimitée et prédictible,

ce qui favorise un rendement plus élevé de récupération par un automate ne disposant pas de système de vision destiné à localiser un tapis bactérien sur la surface de la membrane.

A la suite de cette étape de filtration sur la membrane 6 et en référence à la figure 8, la pompe à vide est éteinte afin de ramener la pression en aval de la membrane 6 à pression atmosphérique. Les microorganismes adhèrent alors à la membrane 6 et peuvent être récupérés / collectés de différentes façons et de manière non limitative :

- par remise en suspension à la pipette 10 avec un liquide en dispensant ce dernier sur une zone de la membrane d'un jet puissant puis en aspirant ce même liquide afin de pouvoir le re-dispenser puissamment sur une autre zone de la membrane. Une série d'une vingtaine de dispense/ré-aspirations est effectuée afin de récolter les bactéries retenues sur toutes les zones de la membrane. L'inclinaison du réservoir de collecte permet au liquide de collecte de se localiser dans la zone préférentielle de collecte en limitant les pertes de volume qu'engendrerait un système de filtration horizontal (éjection rapide d'un liquide, par exemple un tampon neutre ou solvant), voir figure 8. Dans ce but, le réservoir de collecte 5 présente avantageusement au moins une paroi dont au moins une partie est inclinée 11 de manière à permettre à la pipette 10 présentée verticalement de venir prélever les microorganismes collectés sur toute la surface de la membrane 6, sans heurter la paroi du réservoir de collecte 5 ;
- par écouvillonnage de la surface de la membrane 6 : soit avec un écouvillon seul, soit avec un dispositif combinant un cône de pipetage comprenant un écouvillon à son extrémité. Un tel dispositif comprend un cône de pipetage, dont l'extrémité débouchante venant aspirer le liquide, est enveloppée par la partie poreuse d'un écouvillon. L'avantage d'un tel dispositif est de pouvoir aspirer le liquide grâce au cône de pipetage, au travers de la partie poreuse de l'écouvillon, puis de venir au contact de la membrane, ou de tout moyen de filtration du réservoir de collecte, pour « décoller » le concentrât de microorganismes par abrasion, cette opération n'étant pas réalisable avec l'extrémité classique d'un cône de pipetage ;
- En récupérant directement la membrane 6 puis remise en suspension dans un tube ou lyse directe des microorganismes. La membrane 6 est alors montée de manière amovible dans le réservoir de collecte 5 ;
- Par rinçage : arrivée du liquide par la face arrière de la membrane 6. La face arrière de la membrane étant la face dirigée en regard de l'orifice d'aspiration de la membrane 8 et le cas échéant de la partie débouchante 81 du réservoir de collecte 5. Alternativement, le liquide (tampon neutre, tampon contenant des détergents ou

solvant) est déposé sur la membrane 6 dans le réservoir de collecte 5, aspiré, puis refoulé par la face arrière de la membrane 6. Cette opération d'aspiration refoulement peut être réalisée à plusieurs reprises.

Les différentes méthodes de récupération / collecte pourront être adaptées en fonction des microorganismes recherchés ou du type d'échantillon. En effet, certains concentrât de microorganismes présentent une adhérence très forte à la membrane. La collecte des microorganismes est alors impossible par éjection rapide d'un liquide, le jet de liquide n'étant pas suffisamment puissant pour décoller le concentrât. Seule une technique par abrasion (à l'aide d'un écouvillon ou d'un cône de pipetage enveloppé par la partie poreuse d'un écouvillon à son extrémité) étant alors efficace pour décoller le concentrât de la membrane.

Un second mode de réalisation est illustré sur la figure 9. Dans ce mode de réalisation, le réservoir de préfiltration doit être retiré pour pouvoir accéder au réservoir de collecte. Le réservoir de préfiltration est par exemple empilé sur le réservoir de collecte. Un tel dispositif est donc apte à traiter des échantillons biologiques de différentes nature, tel que des urines ou du sang, tout en étant compact. Lorsque le réservoir de préfiltration n'est pas retiré du dispositif, la zone d'aspiration du réservoir de préfiltration est en communication fluidique avec la zone de collecte du réservoir de collecte.

Dans ce mode de réalisation, le dispositif est composé d'un support fixe 20 sur lequel est installé un bloc de filtration 22 pouvant être amovible. Dans le mode de réalisation présenté, le bloc de filtration 22 est maintenu sur le support 20 par l'intermédiaire de deux coulisseaux 23. Le dispositif est relié à un système d'aspiration sous vide (par exemple une pompe), non représenté, et une poubelle qui collecte les liquides filtrés. L'aspiration se fait au travers des orifices d'aspiration du préfiltre 24 et de l'orifice d'aspiration de la membrane 25 situés sur le support fixe 20. Le support fixe 20 comprend ainsi plusieurs orifices d'aspiration formant deux circuits d'aspiration matérialisés par les flèches « A » et « B ». Les deux circuits d'aspiration permettent ainsi d'aspirer en aval de la membrane et/ou en aval du préfiltre indépendamment, par l'intermédiaire des zones d'aspiration des réservoirs de collecte et de préfiltration. Alternativement, si l'aspiration est suffisante en aval de la membrane, le dispositif peut être maintenu sur le support sans l'utilisation de coulisseaux.

L'étanchéité entre le bloc de filtration 22 et le support fixe 20 peut être obtenue par tout moyen. Dans le mode de réalisation présenté, le bloc de filtration 22 est maintenu sur le support fixe 20 et deux joints toriques, non représentés, sont placés entre le bloc de filtration 22 et le

support fixe 20 afin d'assurer l'étanchéité des circuits d'aspiration « aspiration A » et « aspiration B ».

En référence à la figure 10, le bloc de filtration 22 comprend un moyen de filtration , également appelé préfiltre ou un empilement de préfiltres 26, contenu dans un réservoir de préfiltration 28 et qui permet de clarifier les solutions à filtrer sans retenir les microorganismes. Le bloc de filtration 22 comprend également un réservoir de collecte 30, un moyen de filtration, par exemple une membrane 32, disposé dans le fond du réservoir de collecte 30. La membrane 32 est inclinée d'un angle de 30° par rapport au plan formé par la base 200 du support fixe 20, soit de 60° par rapport à la verticale.

Alternativement, le réservoir de collecte 30 présente au moins une paroi dont au moins une partie 34 est inclinée ou en forme d'ogive.

Le bloc de filtration 22 pouvant être amovible, l'orifice d'aspiration du préfiltre 24 coopère alors avec un orifice 24_1 sur le bloc de filtration 22. De même, l'orifice d'aspiration de la membrane 25 coopère avec la partie débouchante du réservoir de collecte 25_1.

Une vanne, non représentée (intégrée ou non au dispositif), permet de gérer le protocole en aspirant soit en aval du préfiltre 26, soit en aval de la membrane 32 (soit en aspiration continue en aval de la membrane 32 et en aspiration alternée en aval du préfiltre 26.

En référence à la figure 11 correspondant au Détail A, le réservoir de collecte 30 peut être réalisé en deux parties assemblées 36 et 38. Dans ce mode de réalisation, la partie supérieure 36 et la partie inférieure 38 coopèrent pour maintenir la membrane 32 en position, par exemple par l'intermédiaire de deux ergots 40. Avantageusement, les deux pièces 36 et 38 sont soudées pour maintenir la membrane.

En référence à la figure 12 correspondant au Détail B, le réservoir de préfiltration 28 peut être réalisé en deux parties assemblées, une partie supérieure 42 et une partie inférieure 44 qui sert de support au préfiltre 26. Dans ce mode de réalisation, la partie supérieure 42 et le support de préfiltre 44 coopèrent pour maintenir le préfiltre 26 en position. Avantageusement et tel que représenté sur la figure 14, la partie supérieure 42 comprend un moyen 33 susceptible de coopérer avec un outil porte pipette d'un robot pipeteur. Le moyen 33 peut également revêtir une forme adéquate (par exemple un ou des orifice(s) ou ergot(s)) permettant d'être manipulé de manière automatique par un élément mécanique (tel qu'une pince), un outil de préhension pour robot pipeteur, un porte pipete, un porte écouvillon, ou directement par l'embout d'un canal de pipetage intégré dans le robot. Avantageusement, ce moyen 33 peut comprendre une partie cylindrique dans laquelle l'outil porte-pipette peut venir s'insérer et être maintenu de manière à

soulever le réservoir de préfiltration 28 et dégager ainsi l'accès à la membrane 32. Dans un mode de réalisation particulier, cette partie cylindrique est maintenue par un ensemble de nervures disposées radialement sur la partie cylindrique de manière à définir au moins un moyen d'accès au préfiltre ou à l'empilement de préfiltres 26. Ce moyen d'accès permettant à un appareil tel qu'un robot pipeteur de présenter un outil à la verticale du préfiltre ou de l'empilement de préfiltre pour venir y dispenser un liquide (e.g. l'échantillon à traiter) et ce, sans manipuler ni heurter la partie supérieure 42.

En référence à la figure 13, le support de préfiltre 44 peut présenter des saillies 46 s'étendant radialement par rapport à l'orifice d'aspiration 45 du support de préfiltre 44. Les saillies 46 sont disposées sur la face en regard du préfiltre, afin de maintenir le préfiltre en position tout en facilitant l'écoulement du filtrat. Avantageusement, les saillies 46 s'étendent radialement par rapport à l'orifice d'aspiration 45 et selon un ou des cercle(s) concentriques ayant pour centre l'orifice d'aspiration 45. La support de préfiltre 44 permet à la fois de supporter le préfiltre ou l'empilement de préfiltres 26 et d'assurer l'étanchéité du réservoir de collecte lors de la mise au vide de ce réservoir, permettant ainsi le passage efficace de l'échantillon à travers le préfiltre ou l'empilement de préfiltres 26.

En référence à la figure 14, un protocole de filtration d'échantillon d'urine utilisant le second mode de réalisation du dispositif comprend les étapes suivantes

1ère étape : Déverser l'urine sur le préfiltre 26. Dans le cas d'un protocole automatisé, l'urine peut être déversée par un robot pipeteur venant se présenter à la verticale du préfiltre 26 au travers du moyen d'accès au préfiltre de la partie supérieure 42. Alternativement, l'urine peut être déversée, manuellement ou automatiquement, directement sur le préfiltre 26 dans le cas où la partie supérieure 42 n'est pas présente.

2ème étape : Activer l'aspiration « A » par l'intermédiaire des orifices d'aspiration 24 et 24_1. L'urine passe à travers le préfiltre 26 et se dépose sur la membrane 32.

3ème étape : Activer l'aspiration « B » par l'intermédiaire des orifices d'aspiration 25 et 25_1. Les microorganismes restent sur la membrane 32. pendant que le « déchet » est aspiré vers la poubelle.

4ème étape : Retirer le réservoir de préfiltration 28 pour accéder à la membrane 32, par exemple à l'aide d'un moyen automatisé tel qu'un outil de robot utilisé pour manipuler des pipettes.

5ème étape : Eventuellement réaliser une ou plusieurs étapes de lavage de la membrane et des microorganismes en distribuant à la pipette (manuelle ou automatisée) des volumes de tampon.

6ème étape : Récupérer les microorganismes. Les microorganismes étant alors concentrés par la force de pesanteur et l'action de l'aspiration dans la partie basse de la pente formée par la membrane 32 et la paroi du réservoir de collecte 30, celle-ci comprenant avantageusement une forme inclinée 34 ou d'ogive. Les microorganismes étant alors concentrés dans une zone délimitée, correspondant à la zone préférentielle de collecte, pour permettre la récupération des microorganismes par un robot de pipetage automatique dans un volume réduit de liquide.

L'étape de récupération / collecte de microorganismes sur la membrane 32 peut être réalisée par les même moyens que ceux énoncés pour le premier mode de réalisation du dispositif selon l'invention.

En référence à la figure 15, un protocole de filtration d'échantillon de sang, préalablement lysé, utilisant le second mode de réalisation du dispositif sans le réservoir de préfiltration 28 comprend les étapes suivantes

1ère étape : Déverser le sang, préalablement lysé, sur la membrane 32.

2ème étape : Activer l'aspiration « B » par l'intermédiaire des orifices d'aspiration 25 et 25_1. Les microorganismes restent sur la membrane 32 pendant que le « déchet » est aspiré vers la poubelle.

3ème étape : Eventuellement réaliser une ou plusieurs étapes de lavage de la membrane et des microorganismes en distribuant à la pipette (manuelle ou automatisée) les volumes de tampon.

4ème étape : Récupérer les microorganismes.

En référence à la figure 16, la récupération des microorganismes peut se faire par remise en suspension à la pipette 48 avec un liquide (éjection rapide du liquide, par exemple un tampon neutre, tampon avec détergents ou solvant). Dans ce but, le réservoir de collecte 30 peut présenter au moins une paroi dont au moins une partie est inclinée 34 de manière à permettre à une pipette 48 présentée verticalement de venir prélever les microorganismes collectés sur toute la surface de la membrane 32 sans heurter la paroi du réservoir 30.

Quel que soit le mode de réalisation envisagé, et de manière non limitative, le dispositif selon l'invention peut également être utilisé avec un écouvillon pour la collection des microorganismes concentrés et retenus sur le moyen de filtration du réservoir de collecte, par exemple une membrane. La collection par écouvillon peut être réalisée soit manuellement soit de manière automatique moyennant une adaptation de l'outil de préhension d'un robot pipeteur.

Le dispositif selon l'invention fonctionne également avec différents type de filtres utilisés dans le réservoir de préfiltration ou le réservoir de collecte, seul ou empilés, et différentes membranes seules ou empilées.

Pour certains liquides peu complexes, le réservoir de préfiltration n'est pas utile. Les échantillons sont directement déposés au-dessus du moyen de filtration du réservoir de collecte, par exemple sur une membrane de filtration, plus particulièrement sur une membrane de 0,2 µm de porosité. Dans le cas où le réservoir de préfiltration n'est pas utile, celui-ci peut être retiré par un outil porte pipette ou porte écouvillon pour robot pipeteur.

Quel que soit le mode de réalisation envisagé, et de manière non limitative, des matériaux de filtration pouvant être utilisés comme moyen de filtration sont donnés à titre d'exemples dans le tableau 1. La taille des pores est adaptée suivant la taille des débris à filtrer. La taille des pores du matériau utilisé comme moyen de filtration peut atteindre 1mm pour permettre de filtrer de gros débris.

Code	fournisseur	matériau	Tailles des pores (ø en µm)
Grille		Grille	< 1000 (1mm)
Filtrona	Filtrona		> 100
VFE (2mm)	Whatman	Fibre de verre	5
Pall PAD	Pall	Cellulose	
Pall 10	Pall	PPE	10
Coton	Magasin grand public	Coton	
Coton20	Prat-Dumas	Coton	20
4	Whatman	Cellulose	20-25
40	Whatman	Cellulose	8-12
41	Whatman	Cellulose	12-16
43	Whatman	Cellulose	10-15
113	Whatman	Cellulose	20

Tableau 1 : exemple de matériaux de filtration

Les moyens de filtration du réservoir de préfiltration, également appelés préfiltres ou empilements de préfiltres utilisés dans le dispositif selon l'invention sont également donnés ci-après. Alternativement, les matériaux employés comme moyen de filtration du réservoir de

préfiltration peuvent être employés comme moyen de filtration du réservoir de collecte, seul ou empilés.

Le dispositif selon l'invention, également appelé dispositif de double-filtration et tel que décrit précédemment est ici appliqué au traitement d'urines inoculées. Dans le tableau comparatif 2, pour chaque moyen de filtration du réservoir de préfiltration, 9 ml d'un ensemble d'échantillons d'urines mélangées constitué de 10 tubes d'urines pathologiques est introduit sur le moyen de filtration dans le réservoir de préfiltration dans lequel on fait le vide doucement au moyen d'une vanne trois voies. Quand le volume est passé au travers du ou des préfiltres, la vanne trois voies est basculée lentement en position Filtre pour faire passer l'urine à travers le moyen de filtration du réservoir de collecte, ici une membrane PES 0,45 µm. La vanne est remise en position fermée.

Le culot bactérien est lavé sur la membrane avec 1 ml de tampon carbonate 50 mM pH8 (vanne filtre ouverte) puis est récupéré avec 400 µl de tampon carbonate (vide stoppé et dispositif remis à pression atmosphérique) ; le volume récupéré varie de 300 à 400 µl. Le volume collecté a été divisé en deux parts dont une part pour réaliser un dosage de protéines après lyse (protocole lyse P2).

Les urines polymicrobiennes contenaient majoritairement :

- *E.aerogenes*: 1,2e7 CFU/mL
- *E.coli*: 3e6 CFU/mL
- *S.aureus*: 1e5 CFU/mL

Le tableau comparatif 2 récapitule les observations faites durant les essais ainsi que les résultats de dénombrement du nombre de CFU par comptage sur boites de gélose bioMérieux chromID® CPS et les résultats de dosage des protéines.

							Observations sur géloses CPS			
Réf. essais	**Réf. préfiltres**	**Durée préfiltration**	**Durée filtration**	**Durée filtration tampon lavage**	**Volume récupération culot bactérien**	**Masse protéines après lyse P2 (µg/essai)**	**Numération**	**bleu vert**	**rose violet**	**beiges**
1-1	2*VFE + filtrona	négligeable préfiltres jaunes	1minute pb de vanne (fendue) 9ml filtrés	30 secondes	340µl	63	>1E+7	nombre env égal aux rose violet	nombre env égal aux bleu vert	qq unes
1-2	2*VFE + filtrona	négligeable préfiltres jaunes	3 minutes 9ml filtrés	50 secondes	350µl	61	1E+04	nombre env égal aux rose violet	nombre env égal aux bleu vert	qq unes
2-1	PALL10+ COTON20+ filtrona	négligeable préfiltres clairs	arrêt à 3min lent+colmatage 4,5ml filtrés	3min50 avec assistance	390µl	45	1E+04	nombre env égal aux rose violet	nombre env égal aux bleu vert	env. 10
2-2	PALL10+ COTON20+ filtrona	négligeable préfiltres clairs	arrêt à 3min lent+colmatage 5ml filtrés	3min50 avec assistance	390µl	53	1E+05	nombre env égal aux rose violet	nombre env égal aux bleu vert	env. 10
3-1	Wattman 43+113+4	rapide mais mousse ds partie filtration	2min40 9ml filtrés	50 secondes	400µl	26	1E+07	nombre env égal aux rose violet	nombre env égal aux bleu vert	qq unes
3-2	Wattman 43+113+4	PF 4 : sale PF 113 : sale PF 43 : sale	arrêt à 3min lent+colmatage 8,3ml filtrés	2min avec assistance	410µl	45	1E+08	plus que rose violet	moins que bleu vert	qq unes
4-1	Wattman 40+41+113+4	rapide? présence mousse	2min 9ml filtrés?	30 secondes	300µl	21	1E+07	majoritaires	bien moins que bleu vert	qq unes
4-2	Wattman 40+41+113+4	rapide? présence mousse	membrane déchirée : culot non récupéré	-	-		-	-	-	-
5-1	PallPAD+coto nbb	négligeable	3min 6ml filtrés	3min avec assistance	390µl	65	1E+07	nombre env égal aux rose violet	nombre env égal aux bleu vert	qq unes
5-2	PallPAD+coto nbb	négligeable	3min 5,5ml filtrés	3min avec assistance	400µl	59	1E+07	majoritaires	moins que bleu vert	qq unes

Tableau comparatif 2 : préfiltres

Préférentiellement, les empilements de préfiltres pouvant être utilisés comme moyen de filtration du réservoir de préfiltration sont :

- 2 * VFE + Filtrona
- Whatmann Paper Filter 43+113+4
- Whatmann Paper Filter 40+41+113+4
- PallPAD + Coton

Quel que soit le mode de réalisation envisagé, et de manière non limitative, les membranes pouvant être utilisées, notamment comme moyen de filtration du réservoir de collecte et à titre d'exemple sont :

- Supor PES 800 membrane, (Pall Gelmann)
- Supor PES 450 membrane, (Pall Gelmann)
- Supor PES 200 membrane, (Pall Gelmann)
- Supor 0.2 Mach V membrane (From Nalgen Filtration Unit)

- Express 0,45 (Millipore)
- GF/F glass fiber depth filter (Whatman)
- Des membranes polymères ayant des porosités entre 0,22 et 1,5µm, préférentiellement entre 0,22 et 1µm, plus préférentiellement entre 0,22 et 0,8µm, encore plus préférentiellement entre 0,22 et 0,45µm : en polypropylene, en Polyethersulfone (PES), en Nylon (Polyamide), en Polytetrafluoroethylen (PTFE), en polycarbonate, en polyester, ou à base de cellulose (Cellulose régénérée, acetate de cellulose, nitrate de cellulose, Mixted Cellluose Ester).
- Des membranes Type Anopore (Anodisc) en aluminium oxide avec des porosité de 0,02 µm (pour les applications de type purification d'exosomes)
- Les membranes de filtration peuvent être des matériaux à basse de silice, polymeres, acetate ou oxide d'alumine à titre d'exemple.

La porosité des moyens de filtration utilisés dans le dispositif selon l'invention sera facilement adaptée par l'homme du métier selon les constituants d'intérêts recherchés dans l'échantillon biologique.

Quel que soit le mode de réalisation envisagé, et de manière non limitative, les écouvillons pouvant être utilisés en combinaison avec l'utilisation d'un cône de pipetage sont :

- écouvillon 1 (VWR) référence 1490241 Flexible swab
- écouvillon 2 (Texwipe) référence TX745B Hard swab

Dans cette utilisation, la partie poreuse de l'écouvillon est dissociée du manche pour venir envelopper la partie débouchante, venant habituellement pipetter le liquide, d'un cône de pipetage.

Le moyen de filtration du réservoir de collecte s'étendant selon un second plan, peut être inclinée d'un angle différent de 30°, soit entre 10 et 60°(qui correspond à un angle entre 30 à 80° par rapport à la verticale) par rapport au plan formé par la base du support fixe. Ceci tout en permettant la concentration des échantillons et leur collecte par un moyen de collecte tel qu'une pipette ou un écouvillon.

Quel que soit le mode de réalisation envisagé, et de manière non limitative, le dispositif peut être muni d'un 3ème réservoir comprenant un troisième moyen de filtration. Ceci afin de réaliser un nouvel étage de filtration pour des composés recherchés dont la taille est comprise entre 0,02 et 0,2 µm tel que des micro-vésicules ou des exosomes.

Le dispositif et procédé correspondant peut être utilisé pour collecter des microorganismes de manière automatique à partir d'échantillons d'urine et d'hémoculture ainsi que pour extraire des éléments biologiques de petite taille tel que des exosomes ou des microvésicules. Le dispositif peut ainsi être employé dans le domaine de l'oncologie en permettant par exemple de concentrer les exosomes (90 nm de diamètre), connus comme marqueur du cancer. La valeur ajoutée est de proposer un procédé rapide, générique et simple pour extraire des exosomes ou microvésicules à partir d'échantillons de salive, sérum ou plasma. Dans ce procédé, le moyen de filtration du réservoir de collecte est une membrane de porosité 0,02 µm. Eventuellement un autre mode de réalisation comprend un troisième réservoir contenant un troisième moyen de filtration en aval du moyen de filtration du réservoir de collecte comprenant une membrane de porosité de 0,02 µm.

EXEMPLES D'UTILISATION DU DISPOSITIF SELON L'INVENTION:

Le dispositif selon l'invention a été testé sur deux types d'échantillons : urines (cliniques et inoculées) et hémocultures (cliniques et inoculées)

Une partie des expériences a pour but d'estimer l'efficacité du dispositif à collecter et restituer les microorganismes (rendement de collecte des microorganismes). Une seconde partie des expériences se déroule jusqu'à l'analyse finale en spectrométrie de masse (ESI ou MALDI) pour identifier ces microorganismes.

Exemple 1 : Expériences en urines inoculées : Résultats sur les trois microorganismes en mode automatique

Microorganismes EC (*Escherichia coli*), SE (*Staphilococcus epidermidis*) et CA (*Candida albicans*).

MO / Réplicat	**EC**	**SE**	**CA**
1	100	37	12
2	78	44	20
3	88	35	18
4	92	40	9
5	91	38	8
6			7
7			15

Tableau 3 : Rendement de récupération (%) des microorganismes E.C, S.E et C.A sur plusieurs réplicats.

Le rendement est défini comme le ratio de la quantité de microorganismes récupérée sur la membrane à la fin du protocole sur la quantité de microorganisme introduite en solution sur le préfiltre.

Cette expérience, illustrée sur la figure 17, permet de conclure au bon fonctionnement du dispositif selon l'invention. Il permet de filtrer efficacement 10 mL d'urine et d'en collecter une fraction non négligeable des microorganismes.

Exemple 2 : Expériences en urines saines inoculées : sur automate pipeteur (4 dispositifs parallèles).

Rendement de filtration sur les microorganismes EC (*Escherichia coli*) et CA (*Candida albicans*) pour différentes configurations (volume et distance à la verticale du filtre) de remise en suspension.

Rendement moyen sur 4 échantillons	EC	CA
Jet faible volume et distance 1 mm	69 %	29 %
Jet faible volume et distance 3 mm	59 %	
Jet grand volume et distance 3 mm	73 %	27 %
Jet grand volume et distance 5 mm	59 %	
Référence en manuel	82 %	

Tableau 4 présentant le rendement de récupération des microorganismes E.C et C.A sur plusieurs réplicats en faisant varier la méthode de remise en suspension automatisée.

Cette expérience a permis de conclure sur la faisabilité d'automatisation du dispositif et sur l'impact du type de la remise en suspension sur le rendement de récupération.

Exemple 3 : Expérience avec des urines pathologiques : Résultats de détection de peptides *E.coli* en LC-ESI MS (mode MRM)

Un lot de quinze urines pathologiques a été traité par double-filtration (DF) avec le dispositif selon l'invention. Le moyen de filtration du réservoir de préfiltration est constitué d'un empilement de préfiltres (ordre allant du bas vers le haut, le préfiltre placé en haut étant le premier à recevoir le liquide): Nylon 30 µm / 2x VFE 5µm / Filtrona 2 mm ou 4 mm (ie 2x2 mm) et comme moyen de filtration du réservoir de collecte une membrane PES 0,45 µm (Pall). L'enchaînement des étapes de pré-filtration / filtration pour 6 à 10 mL d'urine se réalise au maximum en 3 minutes.

Après un lavage avec 1mL d'eau, le concentrât a été collecté par remise en suspension dans 400 µl de tampon carbonate puis soumis au protocole de lyse-digestion (version manuelle) pour être injecté en LC-ESI MS avec une méthode d'acquisition développée de façon non optimisée pour rechercher des peptides qu'on retrouve chez *E.Coli*. La méthode MRM cible 60 peptides dont 7 sont spécifiques de l'espèce *E.coli* et 9 communs à la famille des entérobactéries, les 44 restant doivent être génériques aux Gram-.

Le tableau 5 montre qu'après le traitement par double filtration d'urines de compositions très diverses (quantité de globules blancs, rouges, cellules épithéliales), les peptides spécifiques de *E.coli* sont dans l'ensemble bien détectés pour les urines contenant l'espèce *E.coli* d'après les résultats d'identification sur un automate bioMérieux VITEK®2 fournis. Pour ces mêmes urines, la détection des peptides communs aux entérobactéries est également correcte puisque l'espèce *E.coli* appartient à cette famille. Les urines u10 et u13 contenant des bactéries de la famille des entérobactéries présentent bien des peptides spécifiques de cette famille sans la présence des peptides spécifiques de *E.coli*. L'urine u9 identifiée *C.Koseri* aboutit à la détection de peptides spécifiques de *E.coli* et de peptides communs à la famille entérobactéries. Cette présence d'une population d'*E.coli* conjointement à des colonies de *C.Koseri* est également observée sur milieu de culture bioMérieux ChromID® CPS.

observations/ identifications données par l'hôpital						Résultats bioMérieux		
	Cellules de KOVA			CPS	Vitek2	LC-ESI-MS/MS méthode MRM EC5		
urine	Leucocytes (p/µL)	Hematies (p/µL)	autres paramètres	(cfu/mL)	identification(s)	N peptides totaux détectés (/60)	peptides spécifiques E.coli détectés (maxi=7)	peptides de la famille des enterobacteries détectés (max=9)
u2	400	<5	RAS	10*7	*E.Coli*	59	7	9
u5	1400	<5	RAS	10*7	*E.Coli*	59	7	9
u6	950	2100	Cylindres hématiques	10*7	*E.coli*	59	7	9
u14	3700	<5	RAS	10*7	*E.Coli*	58	7	9
u7	120	230	RAS	10*7	*E.Coli ; Enterococcus*	55	6	9
u9	250	40	RAS	10*7	*C.Koseri*	48	4	8
u8	>5000	NP	RAS	10*6	*E.Coli*	47	4	7
u15	>5000	400	RAS	10*7	*E.Coli ; Enterococcus*	21	3	5
u1	>5000	NP	RAS	10*7	*E.Coli*	27	1	5
u10	2600	130	Levures	10*7	*E.Cloacae, C.albicans, C.non albicans*	35	0	8
u13	3700	<5	RAS	10*7	*Morganella morganii*	25	0	5
u4	850	<5	RAS	10*6	*E.Coli*	2	0	0
u3	240	1400	Cellules épithéliales	10*4	*polymicrobienne*	7	0	0
u11	>5000	670	RAS	10*3	*polymicrobienne*	1	0	0
u12	390	90	RAS	0	*Stérile*	3	0	0

Tableau 5

Le tableau 6 donne les scores de bonne identification de l'espèce E.coli dans un premier lot d' urines pathologiques.

		résultats ESI-MS/MS 7 peptides spécifiques de *E.coli*					
		peptides détectés avec score ≥ 3 (/ 7)		Peptides détectés 1 ≤ score <3 (/ 7)		peptides non détectés	
	Lot n° un. Urines contenant *E.coli*	N urines	(%)	N urines	(%)	N urines	(%)
total	**10**	**8**	**80%**	**1**	**10%**	**1**	**10%**
Mono	5	**4**	**80%**	**1**	**20%**		**0%**
Bimicrobial	5	**4**	**80%**		**0%**	**1**	**20%**

Tableau 6

Un second lot de d'urines pathologiques a donné des résultats confirmant l'efficacité de notre protocole de préparation d'échantillons en amont d'analyses LC-ESI MS en mode ciblé comme l'illustre le tableau 7 pour les cinq urines qui contenaient l'espèce *E.coli*.

		résultats ESI-MS/MS 7 peptides spécifiques de *E.coli*			
		peptides détectés avec score ≥ 3 (/ 7)		Peptides détectés 1 ≤ score <3 (/ 7)	
	Lot n° deux. Urines contenant *E.coli*	N urines	(%)	N urines	(%)
total	**5**	**4**	**80%**	**1**	**20%**
Mono	2	**1**	**50%**	**1**	**50%**
Bimicrobial	3	**3**	**100%**		**0%**

Tableau 7

Expérience avec urines pathologiques : Résultats d'identification par MALDI-TOF

Quinze urines pathologiques ont été traitées par double filtration avec le dispositif selon l'invention avec comme moyen de filtration du réservoir de préfiltration un empilement de préfiltres (ordre allant du bas vers le haut, le préfiltre placé en haut étant le premier à recevoir le liquide): 2x VFE 5µm / Filtrona 2mm et comme moyen de filtration du réservoir de collecte une membrane PES 0,45µm (Pall). Après la rétention des microorganismes sur la membrane,

celles-ci ont été lavées 1 fois par 1 mL d'eau puis collectées en réalisant une trentaine d'aspirations refoulements ou dispense/ré-aspirations avec 400 µL d'eau. Les suspensions obtenues ont été centrifugées 5 min à 10000*g* pour sédimenter les microorganismes et retirer le surnageant. Le culot bactérien a été déposé sur une cible MALDI-TOF avant ajout de la matrice Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (matrice HCCA) ou avec ajout d'acide formique (AF), sèchage puis ajout de la matrice HCCA. Les spectres MALDI-TOF ont été obtenus avec un spectromètre Shimadzu piloté par Launchpad (appareil bioMérieux VITEK® MS). Les résultats d'identifications donnés selon le tableau 8 ont étés obtenus par interrogation de la base de données " bactéries".

observations / identifications données par l'hôpital					Observations BioMérieux		Dual Filtration Manuelle + MALDI-ToF Identification Interrogation base VITEK MS CLI_2.0.0	
N°	Leucocytes (p/µL)	Hématies (p/µL)	CFU/mL	**VITEK2 identification**	CFU/mL at reception	Contami-nation level	**P1 : DF + HCCA**	**P2 : DF + AF + HCCA**
80	>5000	<5	1E+07	ENT.CLC	1,E+07	B*	ENT.CLC et ENT.ASB	ENT.CLC et ENT.ASB
p66	570	<5	1E+07	ESC.COL	1,E+07	B majo	ESC.COL	ESC.COL
p67	>5000	<5	1E+07	ESC.COL	1,E+07	B majo	ESC.COL	ESC.COL
p69	>5000	900	1E+07	ESC.COL	1,E+07	M	ESC.COL	ESC.COL
p71	>5000	<5	1E+06	ESC.COL	1,E+06	B majo	ESC.COL	ESC.COL
p75	2000	<5	1E+07	ESC.COL	1,E+07	M	ESC.COL	ESC.COL
76	1600	<5	1E+07	PRT.MIR	1,E+07	B majo	PRT.MIR	PRT.MIR
p70	>5000	<5	1E+07	ESC.COL + ENC.FEC	1,E+07	B*	ENC.FEC	ESC.COL
p64	ND	>5000	1E+07	PSD.AEU + ENC.FEC	1,E+07	B*	PSD.AEU	PSD.AEU
p65	700	>5	1E+07	Flore polymorphe	1,E+07	P	KLB.OXY	No ID
79	740	23	1E+03	Flore polymorphe	1,E+04	P	No ID	Low discrim
p68	210	<5	0E+00	stérile	1e3/1e4	S	coryn. Urealyticum ou Low discrim	Low discrim
p73	50	1100	1E+03	stérile	1e3/1e4	S	No ID	No ID
77	90	<5	0E+00	stérile	0,E+00	S	No ID	No ID
78	330	<5	1E+03	stérile	0,E+00	S	No ID	No ID

Tableau 8

B*= urines bi-microbiennes avec 2 espèces à des concentrations voisines.

Les résultats d'identification peuvent être présentés comme suit (voir également tableau 9) :

13 urines types sont exploitées :

- 4 stériles,
- 2 mono-microbiennes,
- 4 bi-microbiennes (avec une espèce majoritaire),
- Et 3 bi-microbiennes (avec deux espèces de concentrations proches)

Selon le mode de dépôt sur la cible MALDI (HCCA sans AF (Acide Formique) et avec AF avant l'ajout d'HCCA), 90 % et 100% de bonne identification ont été obtenus au niveau de l'espèce (sur ce panel de 10 urines dont les positives sont à minima à 10^e6 CFU/mL).

Pour les 3 bi-microbiennes (avec deux espèces de concentrations proches), seule une espèce peut être identifiée à la fois sur un dépôt.

Ces résultats illustrent bien qu'une double filtration rapide des urines brutes à l'aide du dispositif selon l'invention permet de purifier suffisamment et de collecter assez de micro-organismes pour une identification exacte de celles-ci par MALDI-TOF.

		Identifications correctes par MALDI-ToF versus Vitek2					
						Bi-microbiennes	
						2 espèces de concentration identique	
Protocole	N urines	Stériles **(S)**	Mono-microbiennes **(M)**	Bi-microbiennes Avec 1 espèce prédominante **(B)**	Score **(S+M+B)**	Identif. d'1 espèce	Identif. des 2 espèces
P1: DF + HCCA	13	**3/4**	**2/2**	**4/4**	9/10 (90%)	3/3	0/3
P2: DF+ AF+ HCCA	13	**4/4**	**2/2**	**4/4**	10/10 (100%)	3/3	0/3

Tableau 9

Exemple 4 : Expérience avec hémocultures inoculées : Résultats de détection de peptides en LC-ESI MS (mode MRM)

Le protocole de lyse-filtration consiste brièvement en une lyse sélective des cellules du sang par action d'un tampon contenant un tensioactif pendant un temps court.

L'avantage apporté par le dispositif ci-décrit est de par sa géomètrie, ici une inclinaison du moyen de filtration du réservoir de collecte de 30°, qui permet la récolte efficace des micro-organismes au moyen d'une solution liquide conduisant *in fine* à une suspension bactérienne.

Le protocole Lyse-filtration est le suivant :

- La filtration est faite sur une membrane de filtration 0,2 µm PES utilisé comme moyen de filtration du réservoir de collecte sur le dispositif selon l'invention.
- La prise d'essai est de 0,8 mL d'hémoculture qui sont traitées par 0,4 mL de tampon CAPS 0,3 M/ Brij 0,45% pendant 2 minutes suivi de la filtration pendant 2 minutes.
- 3 lavages avec 175 µL de Wash buffer 1(NaCl 0,45%/ Brij 97 0,005%)
- 1 lavage avec 175 µL de Wash buffer 2 (Wash Buffer 2: Brij 97 0,005%)
- La collecte est faite avec 200µL de tampon carbonate en respectant un nombre constant d'aspirations/refoulements (30) ou de dispense/ré-aspirations (30). La répétition de la collecte, une 2nde, une 3ème et une 4ème fois sur la même membrane a également été testée. La lyse digestion a été faite avec le P2A sur un robot pipeteur Hamilton. La démonstration a été faite pour *E.Coli*, *S.epidermidis* et *C.albicans* avec une bonne détection des peptides ciblés par la méthode MRM. La figure 18 présente les résultats de détection via les méthodes MRM adaptées au micro-organisme inoculé dans les bouteilles d'hémocultures. Les trois graphes montrent pour les 3 micro-organismes la bonne détection des peptides spécifiques dans les échantillons positifs à J_0 *post* culture (EC1 J_0, EC2 J_0, CA1 J_0, CA2 J_0, CA3 J_0,SE1 J_0 SE2 J_0, SE3 J_0). Un nombre mineur de peptides (2 à 4) sont détectés dans les contrôles négatifs (Cneg). La différence significative tant du nombre de peptides détectés que de l'aire cumulée entre les échantillons positifs et les contrôles négatifs indique que le protocole réalisé sur le dispositif décrit permet bien de récolter les bactéries contenues dans les hémocultures.

D'autre hémocultures ont aussi été traitées de la même façon mais après la collecte des microorganismes, nous avons réalisé le protocole I_0 afin d'identifier en LC-ESI-MS à l'aide des profils protéiques. Les résultats présentés dans le tableau 10 montrent que les 8 hémocultures *E.coli* sont bien identifiées en LC-ESI avec l'algorithme Cross-Cor en interrogeant la base de données urine mais qu'il y a confusion avec *Shigella* si c'est la base culture qui est interrogée, les espèces étant proches. Les quatre hémocultures avec levures (*C.Albicans*) sont correctement identifiées (sur quatre). Une seule hémoculture *S.epidermidis* est bien identifiée (sur quatre). Malgré ces quelques cas de mauvaises identifications, ces essais attestent de

l'efficacité de la préparation d'échantillon par lyse-filtration réalisée sur le dispositif selon l'invention.

	Non dilués				dilués 10x			
	pic_ crossCor	sum_nnls	pic_ crossCor	sum_nnls	pic_ crossCor	sum_nnls	pic_ crossCor	sum_nnls
	BaseUrine	BaseUrine	BaseCulture	BaseCulture	BaseUrine	BaseUrine	BaseCulture	BaseCulture
CAN.ALB_001	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	CAN.TROP	TRUE	BAC.CEU
CAN.ALB_002	TRUE	CAN.TROP	TRUE	TRUE	TRUE	CAN.TROP	TRUE	BAC.CEU
CAN.ALB_003	TRUE	CAN.TROP	TRUE	TRUE	TRUE	CAN.TROP	TRUE	BAC.CEU
CAN.ALB_004	TRUE	CAN.TROP	TRUE	TRUE	TRUE	CAN.TROP	TRUE	BAC.CEU
ESH.COL_001	TRUE	TRUE	SHG.BOY	ENT.CLC	TRUE	CAN.GLB	SHG.BOY	BAC.CEU
ESH.COL_002	TRUE	ENT.AER	SHG.FLX	ENT.CLC	TRUE	CAN.GLB	SHG.FLX	BAC.CEU
ESH.COL_003	TRUE	ENT.AER	SHG.FLX	ENT.CLC	TRUE	CAN.GLB	SHG.SON	CAN.ALB
ESH.COL_004	TRUE	ENT.AER	SHG.FLX	ENT.CLC	TRUE	CAN.GLB	SHG.BOY	BAC.CEU
ESH.COL_005	TRUE	ENT.AER	SHG.BOY	ENT.CLC	TRUE	CAN.GLB	SHG.FLX	CAN.ALB
ESH.COL_006	TRUE	ENT.AER	SHG.SON	ENT.CLC	TRUE	CAN.GLB	SHG.SON	BAC.CEU
ESH.COL_007	TRUE	ENT.AER	SHG.FLX	ENT.CLC	TRUE	CAN.GLB	SHG.FLX	CAN.ALB
ESH.COL_008	TRUE	ENT.AER	SHG.SON	ENT.CLC	TRUE	CAN.GLB	SHG.BOY	CAN.ALB
STA.EPI_001	STA.AUA	TRUE	STA.AUA	TRUE	CAN.TRO	CAN.TRO	STR.ORA	BAC.CEU
STA.EPI_002	STA.AUA	CAN.TROP	BAC.CEU	CAN.ALB	CAN.GLB	CAN.GLB	BAC.CEU	BAC.CEU
STA.EPI_003	PRT.MIR	TRUE	YER.ETC	TRUE	STA.AUA	CAN.TRO	BAC.CEU	BAC.CEU
STA.EPI_004	TRUE	CAN.TROP	TRUE	CAN.ALB	STA.AUA	CAN.GLB	STA.AUA	BAC.CEU
HEM.NEG0013453	ENT.AER	CAN.TROP	STR.ORA	BAC.CEU	CIT.KOS	NA	STR.ORA	NA
HEM.NEG0013454	ENT.AER	CAN.TROP	STR.ORA	BAC.CEU	ENT.AER	NA	CIT.BRA	NA
16	13	4	5	6	12	0	4	0
Correct Identifications (%)	**81,25**	**25**	**31,25**	**37,5**	**75**	**0**	**25**	**0**

Tableau 10 : Résultats d'identification en LC-ESI MS après Lyse filtration sur le dispositif tel que décrit et extraction de protéine I_0 (mode full scan, profil protéique)

Procédé alternatif sur échantillon d'urine utilisant le dispositif selon l'invention :

Les différentes étapes de la manipulation sont données ci-dessous :

1) A réception, les urines sont photographiées.
2) Estimation des volumes dans les tubes (comparé à un tube gradué)
3) 10 µL sont déposés sur gélose bioMérieux ChromID® CPS pour vérification.
4) 150 µl ont été mis de côté à 4°C pour faire un étalement de 100µL sur COS pour 5H00 de croissance.

5) Le reste de l'échantillon a été traité avec le dispositif selon l'invention. Le moyen de filtration du réservoir de préfiltration consiste en un empilement des préfiltres. Les préfiltres utilisés étant, du bas vers le haut : 1x VFE 5 µm / Filtrona 2 mm. Le moyen de filtration du réservoir de collecte où seront récupérées les bactéries est une membrane: PES 0,45 µm (Pall)

6) Le volume d'urine filtrée est compris entre 3 et 6 mL pour un temps de filtration de quelques minutes. La collecte du concentrât est fait avec 1000 µL d'eau (Versol).

7) A l'issue du protocole manuel, 10 µl sont étalés sur gélose bioMérieux ChromID® CPS pour permettre de voir si la population bactérienne est la même entre la fraction collectée et l'urine de départ (couleur des colonies, polymorphisme, comparaison numération avant/après double filtration).

8) Pour le volume restant des fractions collectées, une centrifugation de 5 min 10000*g* a été faite pour enlever le maximum de surnageant (eau) et garder un culot de quelque µL pour MALDI-TOF.

9) Les dépôts sur plaque MALDI-TOF sont faits en doublons selon la terminologie du tableau 11

10) La manipulation par culture courte de 5h00 est faite en déposant 100 µl d'urine et étalement au râteau. Après 5H00 de croissance à 37°C, le biofilm est observé. Ce biofilm est alors collecté avec une oese de 1 µL et déposé sur cible MALDI-TOF.

Protocole 1 (P1) : **double filtration** + HCCA	Protocole 2 (P2) : **double filtration** + **AF** + HCCA
Protocole 5 (P5) : **culture sur COS 5H** + HCCA	Protocole 6 (P6) : **culture sur COS 5H** + **AF** + HCCA

Tableau 11 : Codification des protocoles selon le traitement réalisé et le mode de dépôt sur cible MALDI-TOF

HCCA : (Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique) : 1µl par spot

AF: (Acide Formique) : 0,5µl par spot

double filtration : traitement à l'aide du dispositif selon l'invention

Revendications

1) Dispositif pour la préparation d'échantillon biologique comprenant :

- un support fixe dont la base s'étend selon un premier plan,
- un bloc de filtration pouvant être amovible,

ledit bloc de filtration comprenant un réservoir de collecte comprenant lui-même une paroi et un moyen de filtration, le moyen de filtration s'étendant selon un second plan et divisant ledit réservoir de collecte en une zone de collecte et une zone d'aspiration, la zone d'aspiration étant adaptée pour être connectée à un moyen d'aspiration,

caractérisé en ce que le second plan du moyen de filtration est incliné par rapport au plan de la base du support fixe.

2) Dispositif selon la revendication 1, dans lequel le bloc de filtration comporte en outre un réservoir de préfiltration pouvant être amovible,

ledit réservoir de préfiltration comprenant un moyen de filtration divisant le réservoir de préfiltration en une zone de collecte et une zone d'aspiration,

la zone d'aspiration du réservoir de préfiltration étant en communication fluidique avec la zone de collecte du réservoir de collecte.

3) Dispositif selon la revendication 2, la zone d'aspiration du réservoir de préfiltration étant adaptée pour être connectée à un second moyen d'aspiration

4) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel la paroi de la réservoir de collecte dans la zone de collecte est en partie inclinée ou en forme d'ogive

5) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, le moyen de filtration du réservoir de collecte comprenant au moins une membrane de porosité comprise entre 0,02 et 1,5µm, préférentiellement entre 0,02 et 1µm, plus préférentiellement entre 0,02 et 0,8µm, encore plus préférentiellement entre 0,02 µm et 0,45 µm

6) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, le moyen de filtration du réservoir de préfiltration comprenant au moins un filtre de porosité comprise entre 5 µm et 1000 µm, préférentiellement entre 5 µm et 100 µm.

7) Dispositif selon la revendication 6, le moyen de filtration du réservoir de préfiltration comprenant un empilement de filtres

8) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, le second plan du moyen de filtration du réservoir de collecte étant incliné par rapport au plan de la base du support fixe d'un angle compris entre 10° et 60°, de préférence égal à 30°

9) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, le réservoir de collecte comprenant une partie supérieure et une partie inférieure coopérant pour maintenir le moyen de filtration du réservoir de collecte

10) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, le réservoir de préfiltration comprenant une partie supérieure et une partie inférieure coopérant pour maintenir le moyen de filtration du réservoir de préfiltration

11) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 2 à 10, le réservoir de préfiltration comprenant un moyen susceptible de coopérer avec un outil pour robot pipeteur tel qu'un porte pipette ou un porte écouvillon.

12) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 2 à 11, dans lequel le bloc de filtration comporte en outre un troisième réservoir de filtration pouvant être amovible, ledit troisième réservoir de filtration comprenant un moyen de filtration divisant le troisième réservoir de filtration en une zone de collecte et une zone d'aspiration,

la zone de collecte du troisième réservoir de filtration étant en communication fluidique avec la zone d'aspiration du réservoir de collecte.

13) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, le moyen d'aspiration étant un moyen d'aspiration / refoulement.

14) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ; la paroi du réservoir de collecte et le moyen de filtration formant une zone préférentielle de collecte.

15) Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour le traitement d'un échantillon biologique.

15) Procédé de traitement d'un échantillon biologique à l'aide d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 comprenant les étapes suivantes:

- déposer l'échantillon biologique sur le moyen de filtration du réservoir de collecte
- aspirer l'échantillon biologique au travers du moyen de filtration du réservoir de collecte, à l'aide du moyen d'aspiration connecté à la zone d'aspiration du réservoir de collecte

- collecter les microorganismes sur le moyen de filtration du réservoir de collecte

16) Procédé de traitement d'un échantillon biologique à l'aide d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 2 à 14 comprenant les étapes suivantes: .

- déposer l'échantillon biologique sur le moyen de filtration du réservoir de préfiltration,
- aspirer l'échantillon biologique au travers du moyen de filtration du réservoir de préfiltration de manière à déposer l'échantillon biologique sur le moyen de filtration du réservoir de collecte à l'aide du moyen d'aspiration connecté à la zone d'aspiration du réservoir de collecte
- aspirer l'échantillon biologique au travers du moyen de filtration du réservoir de collecte à l'aide du moyen d'aspiration connecté à la zone d'aspiration du réservoir de collecte
- collecter les microorganismes sur le moyen de filtration du réservoir de collecte

17) Procédé de traitement d'un échantillon biologique à l'aide d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 3 à 14 comprenant les étapes suivantes: .

- déposer l'échantillon biologique sur le moyen de filtration du réservoir de préfiltration,
- aspirer l'échantillon biologique au travers du moyen de filtration du réservoir de préfiltration de manière à déposer l'échantillon biologique sur le moyen de filtration du réservoir de collecte à l'aide du second moyen d'aspiration connecté à la zone d'aspiration du réservoir de préfiltration
- aspirer l'échantillon biologique au travers du moyen de filtration du réservoir de collecte à l'aide du moyen d'aspiration connecté à la zone d'aspiration du réservoir de collecte
- collecter les microorganismes sur le moyen de filtration du réservoir de collecte

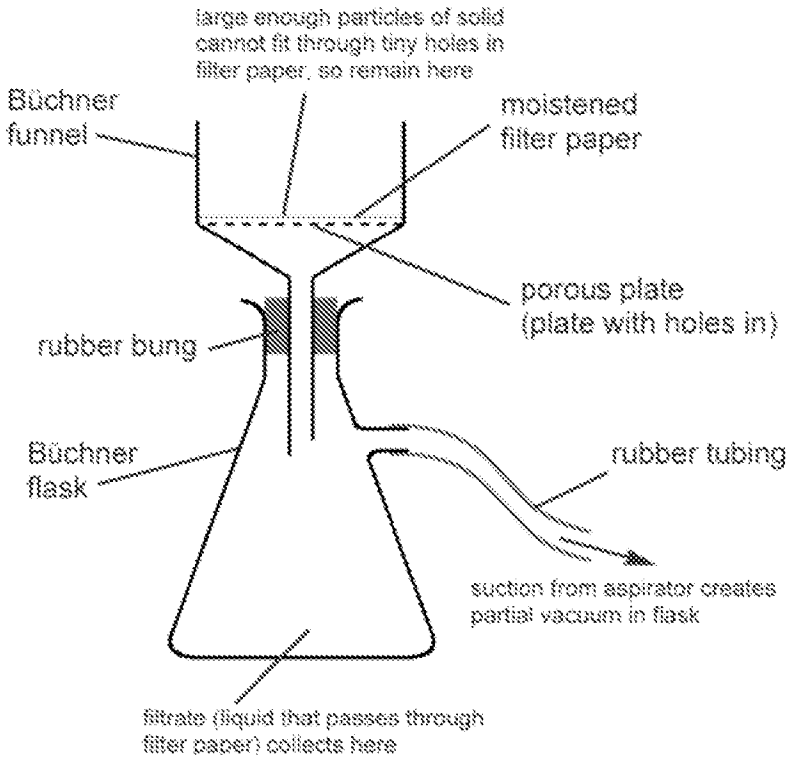

large enough particles of solid cannot fit through tiny holes in filter paper, so remain here
Büchner funnel
moistened filter paper
porous plate (plate with holes in)
rubber bung
Büchner flask
rubber tubing
suction from aspirator creates partial vacuum in flask
filtrate (liquid that passes through filter paper) collects here

FIG. 1

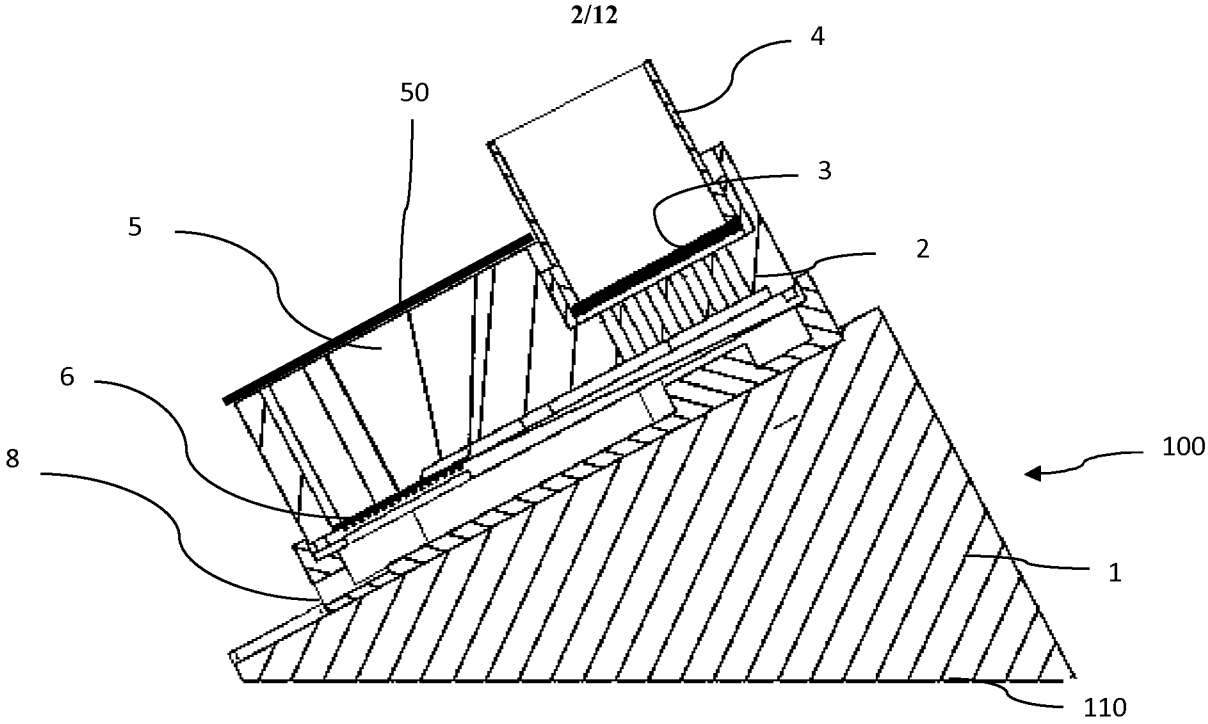


FIG. 2

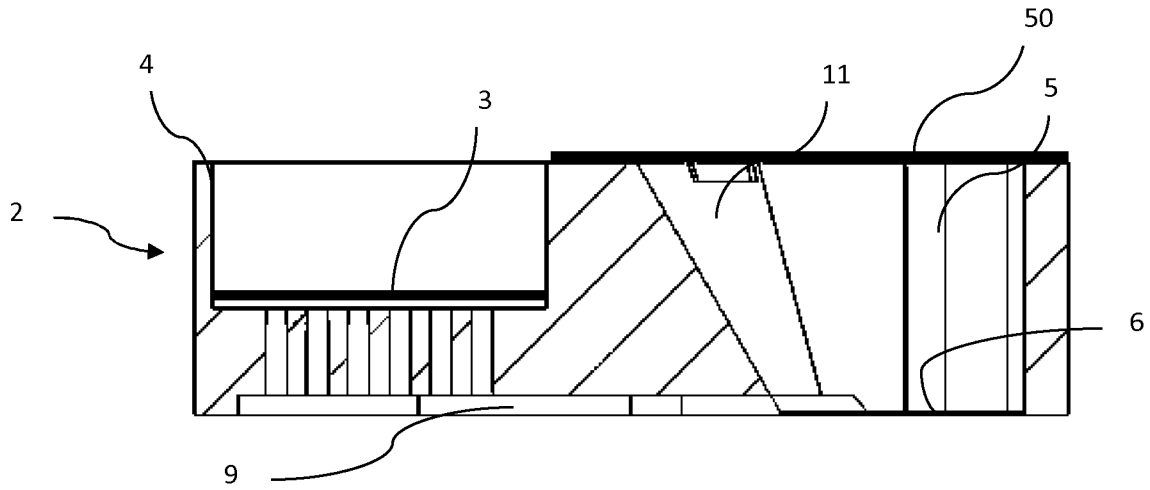


FIG. 3

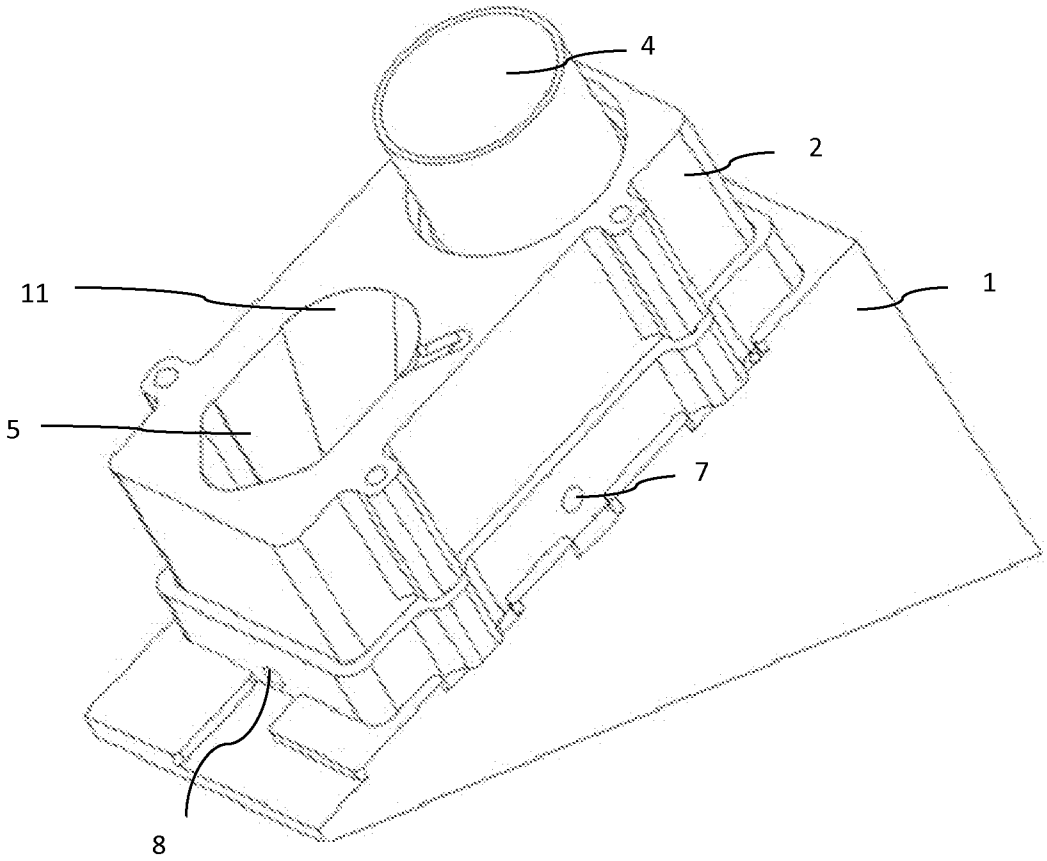


FIG. 4

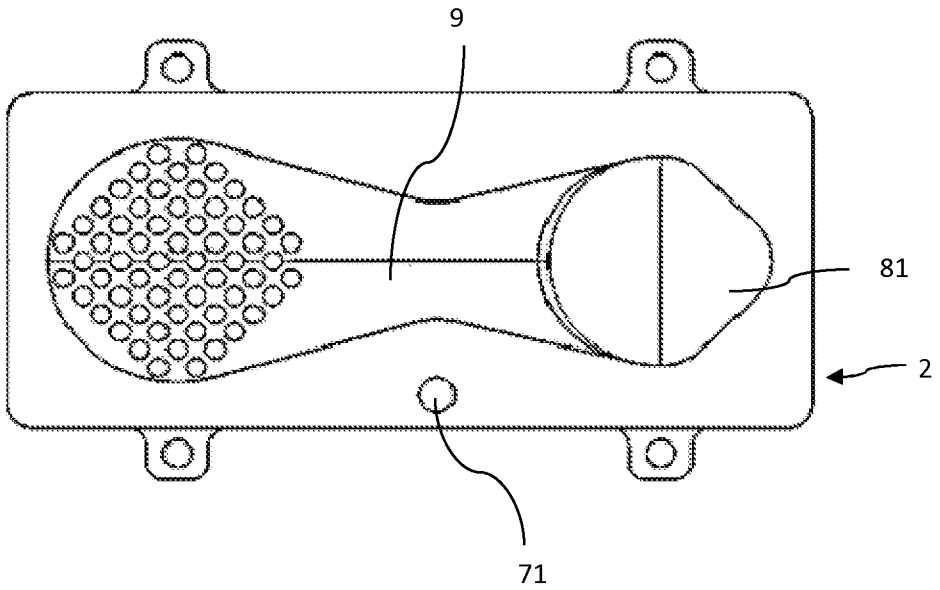


FIG. 5

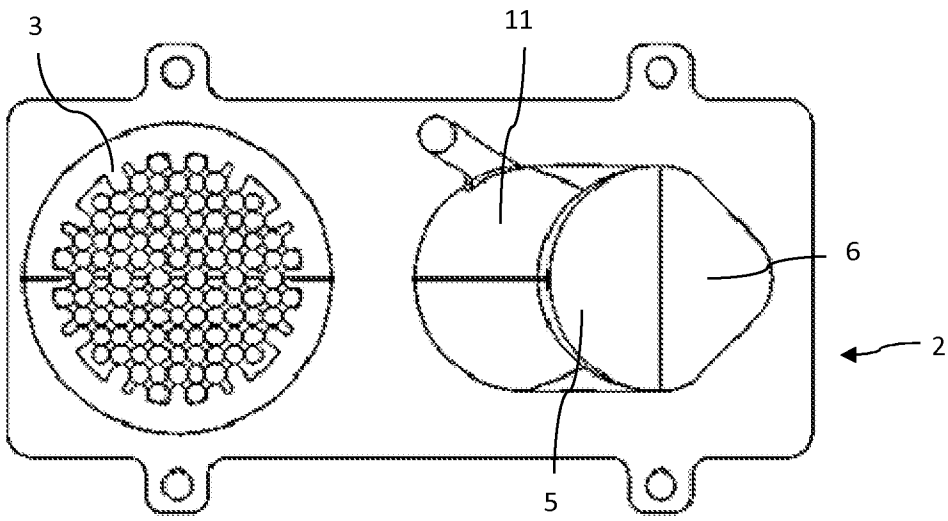


FIG. 6

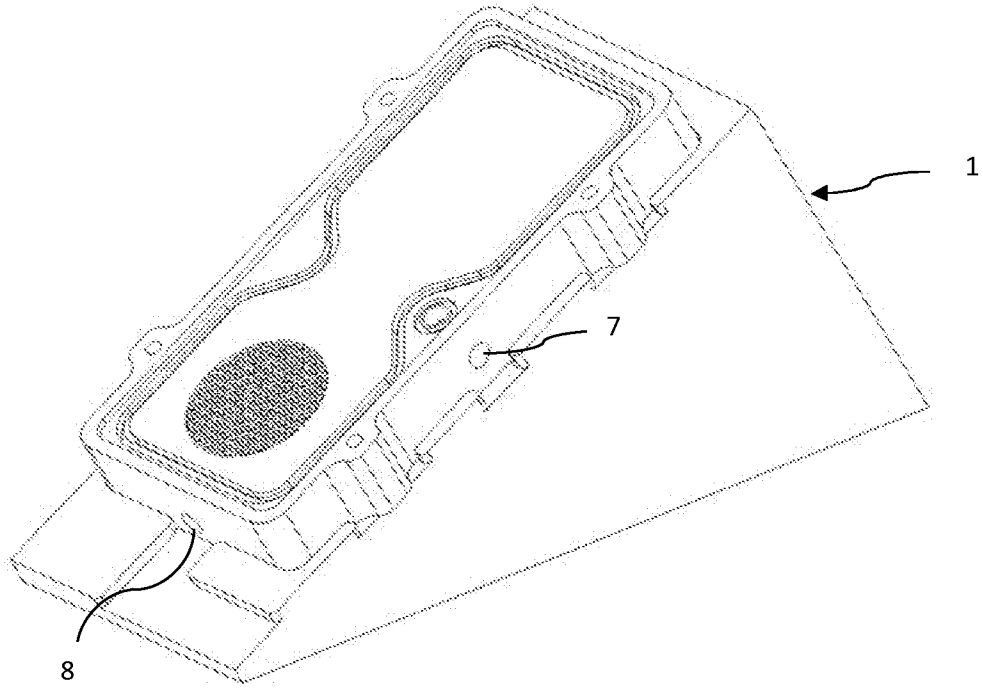


FIG. 7

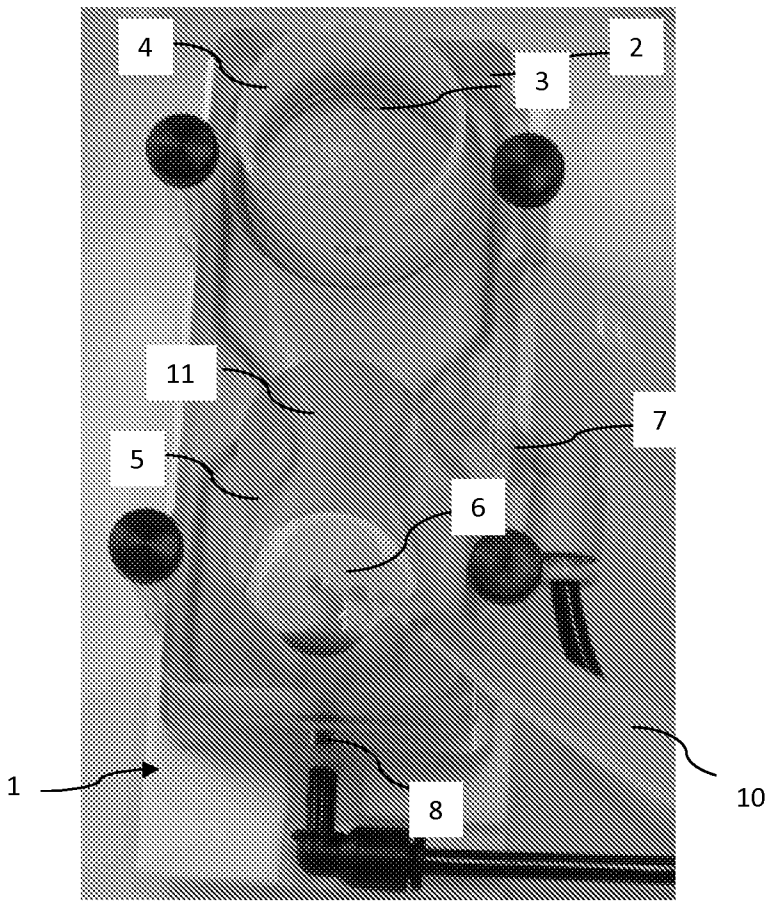


FIG.8

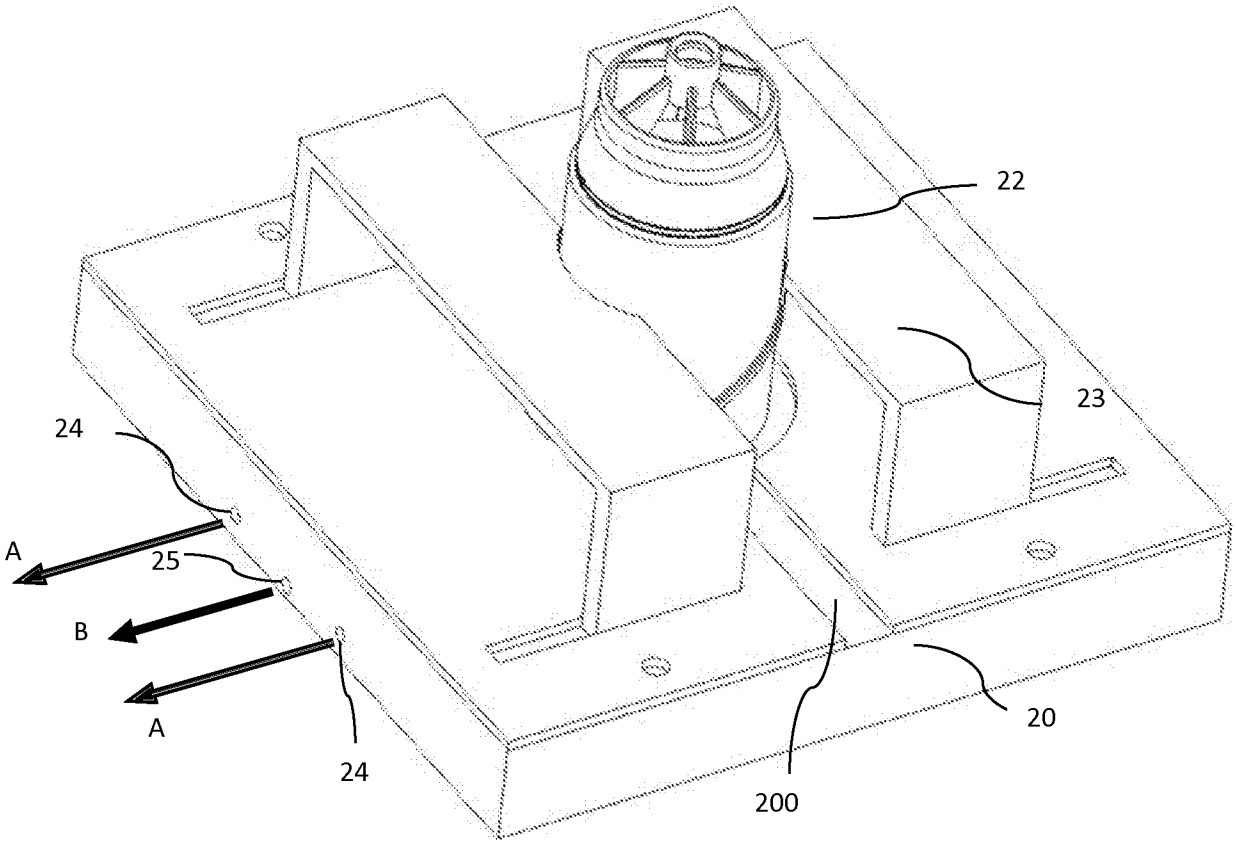


FIG. 9

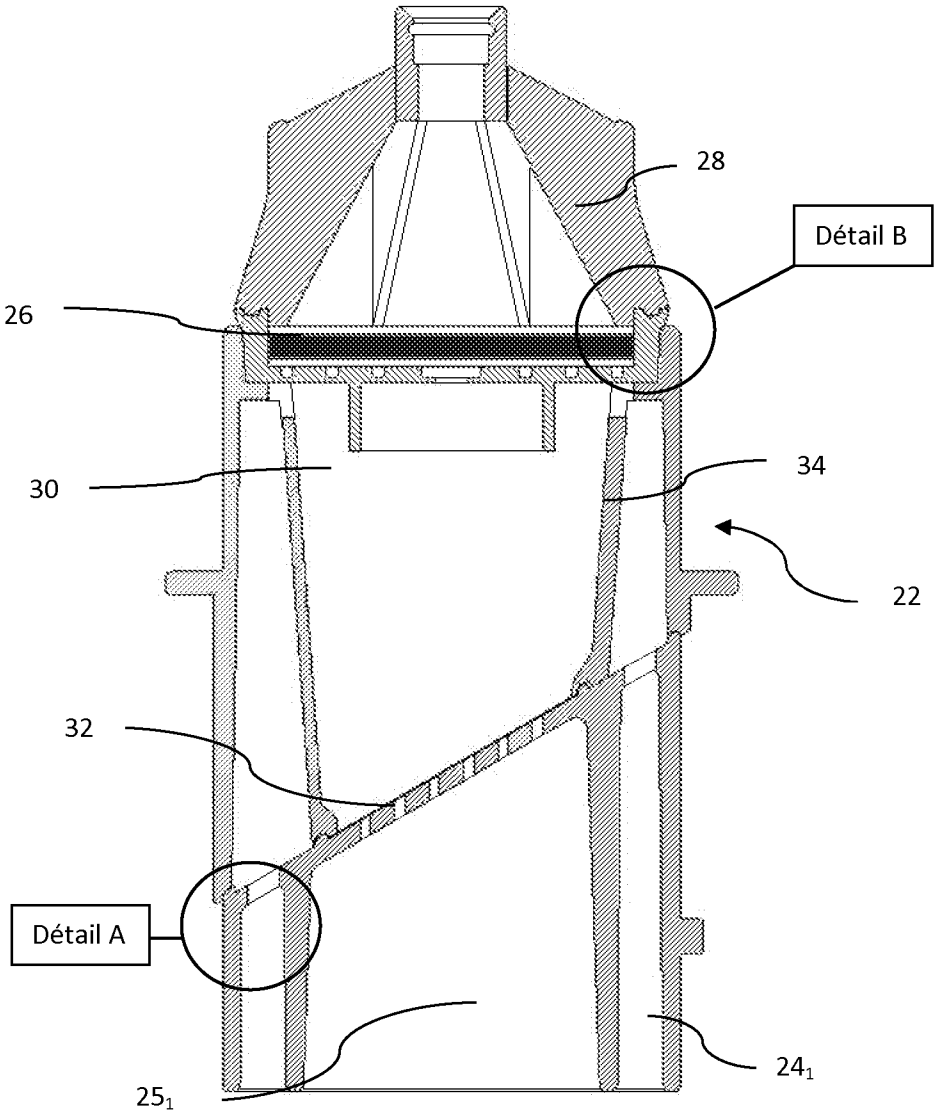


FIG. 10

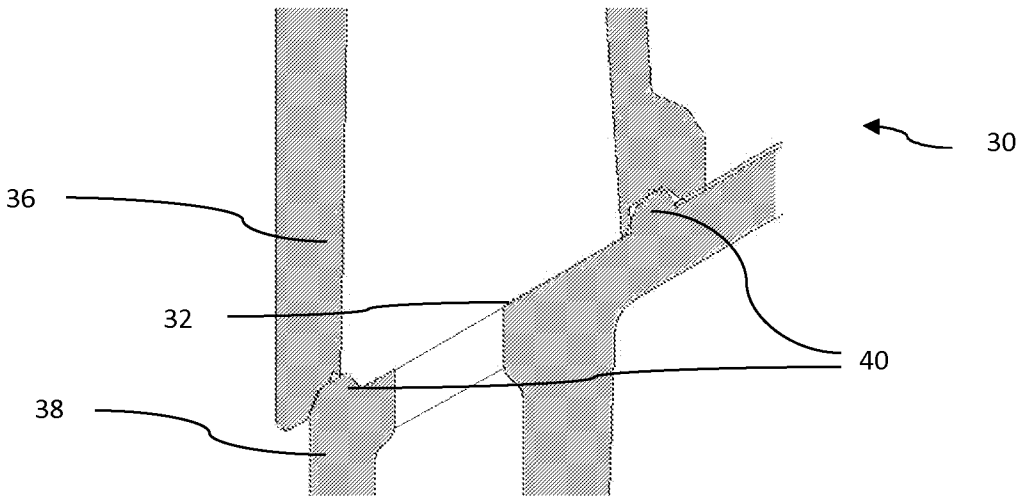


FIG. 11

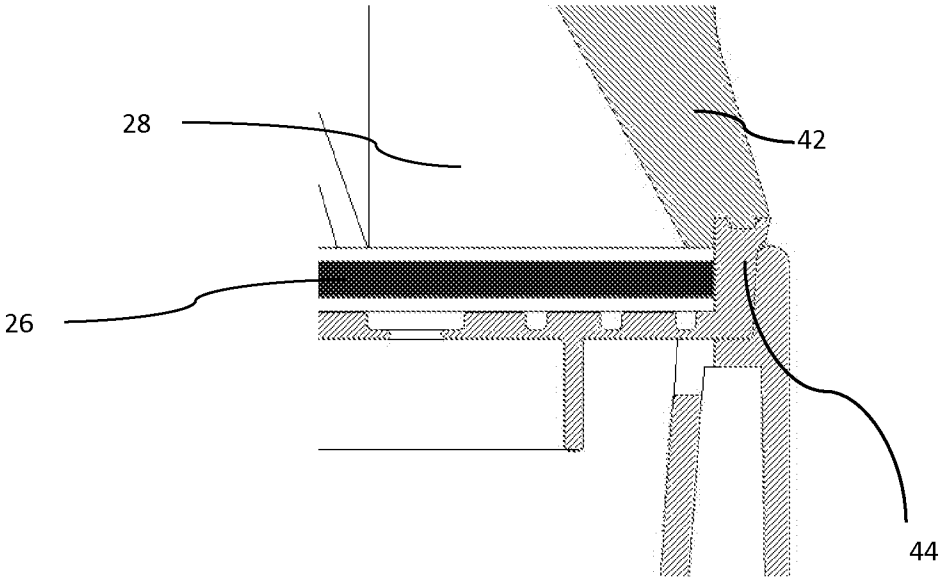


FIG. 12

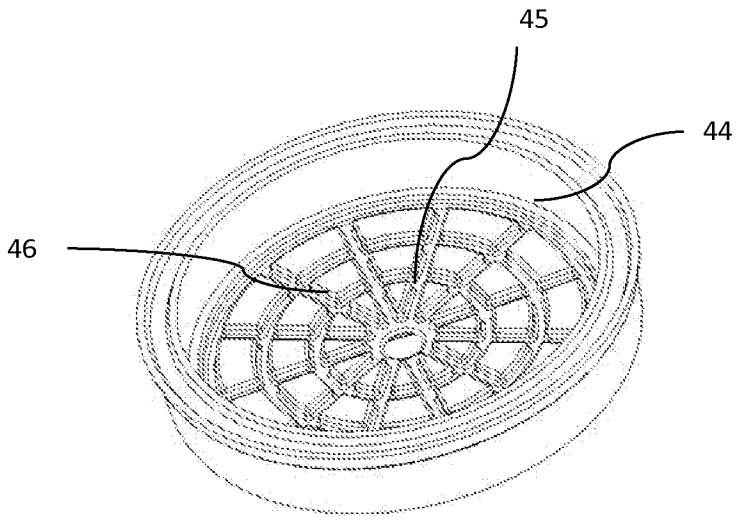


FIG. 13

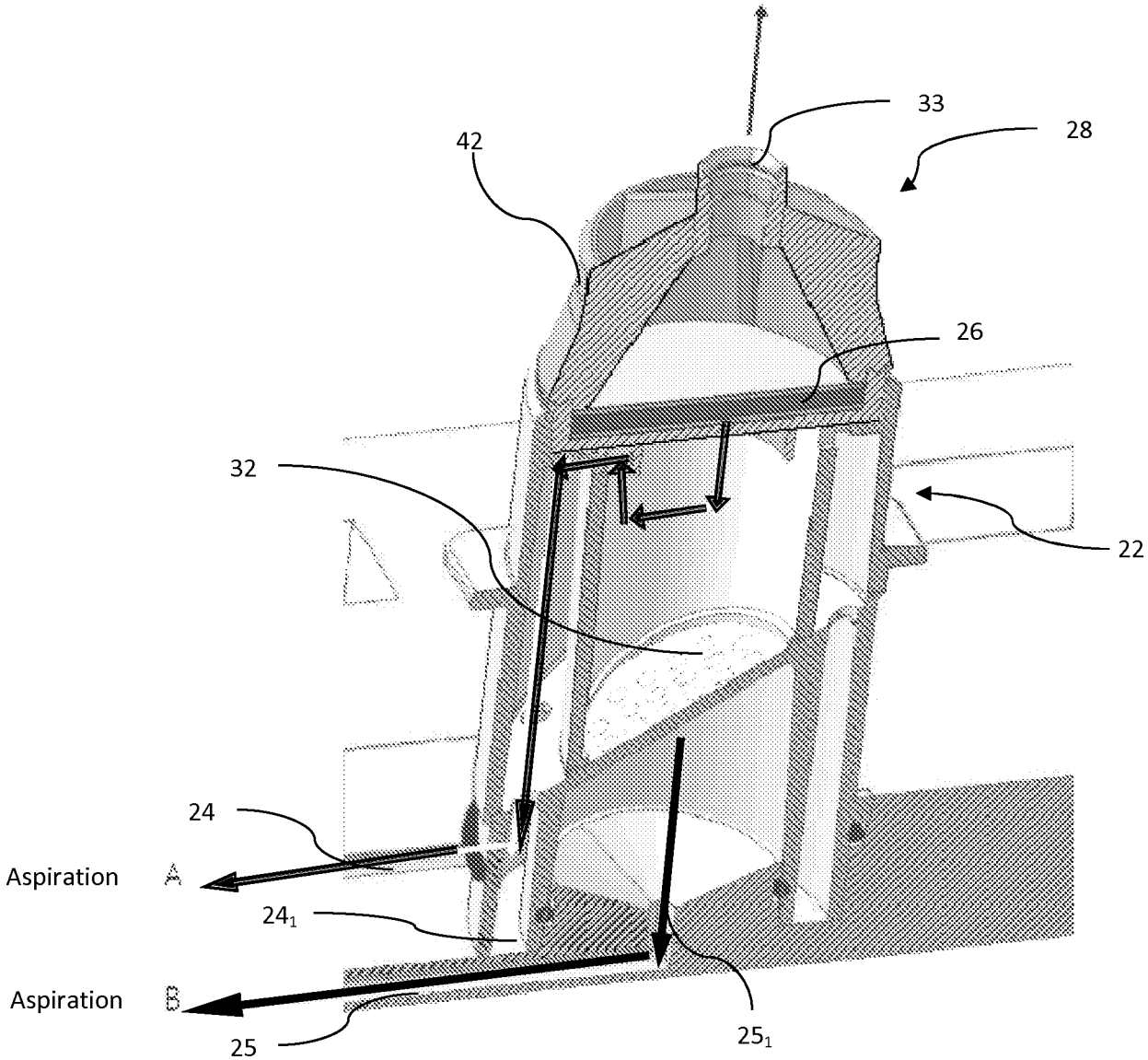


FIG. 14

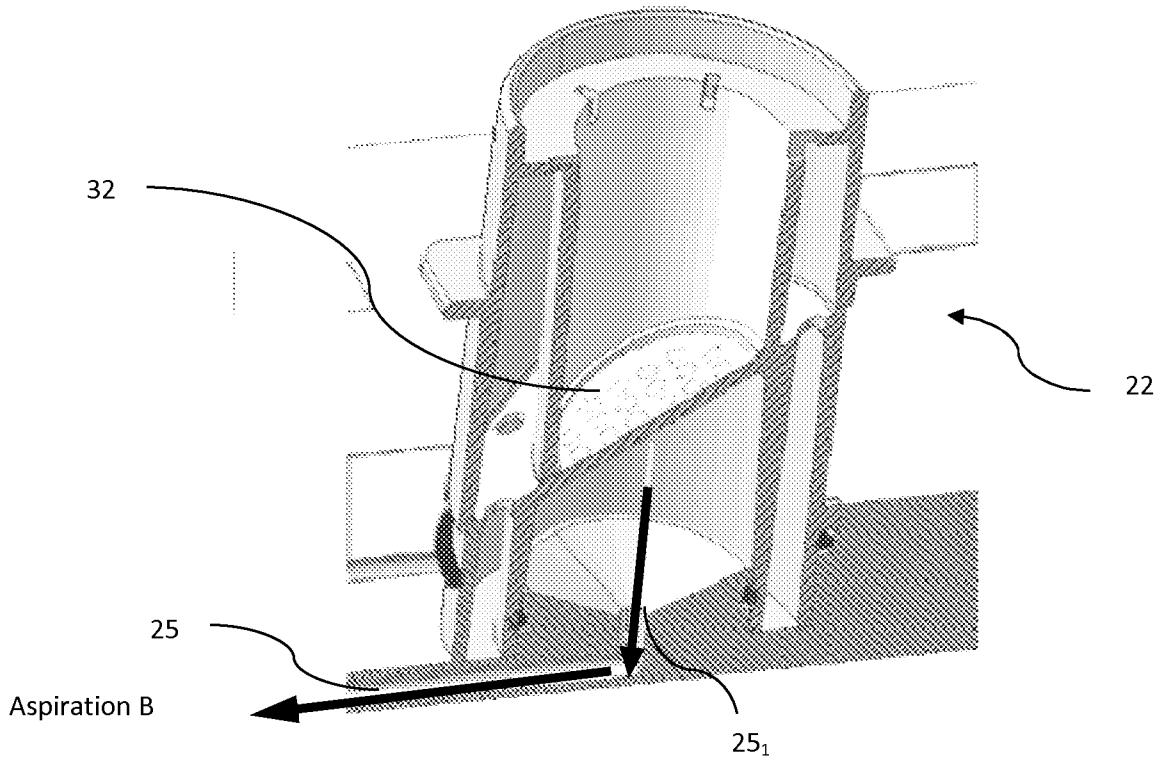


FIG. 15

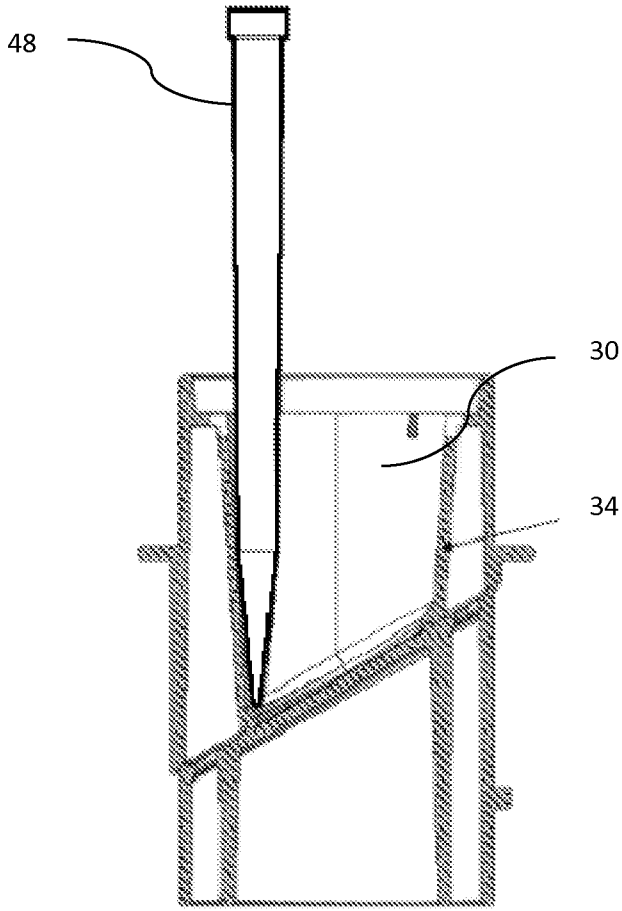


FIG. 16

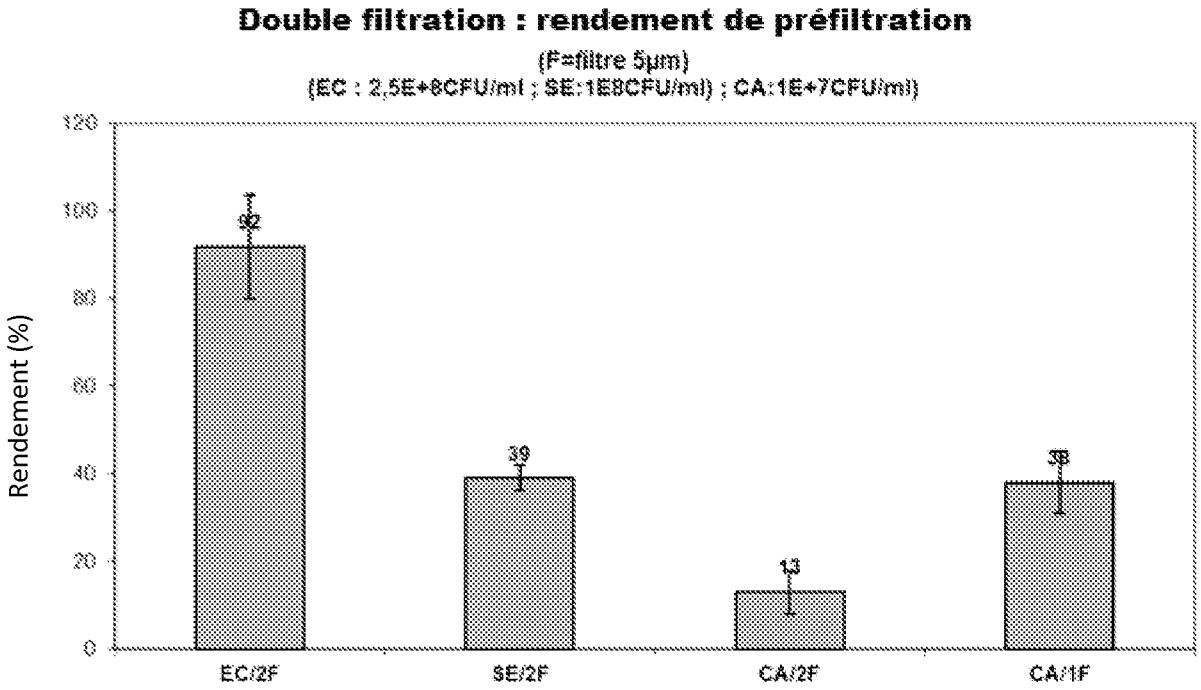
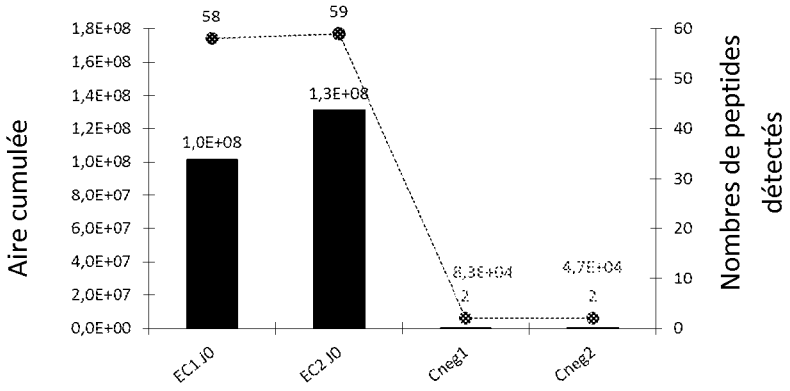
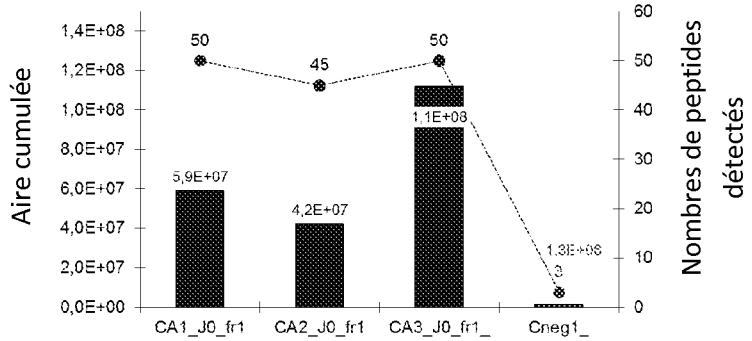

Double filtration : rendement de préfiltration
(F=filtre 5µm)
(EC : 2,5E+8CFU/ml ; SE:1E8CFU/ml) ; CA:1E+7CFU/ml)
Rendement (%)
120
100
80
60
40
20
0
92
39
13
38
EC/2F
SE/2F
CA/2F
CA/1F

FIG. 17

Lyse filtration à l'aide du dispositif selon l'invention sur hémocultures inoculées (J_o)





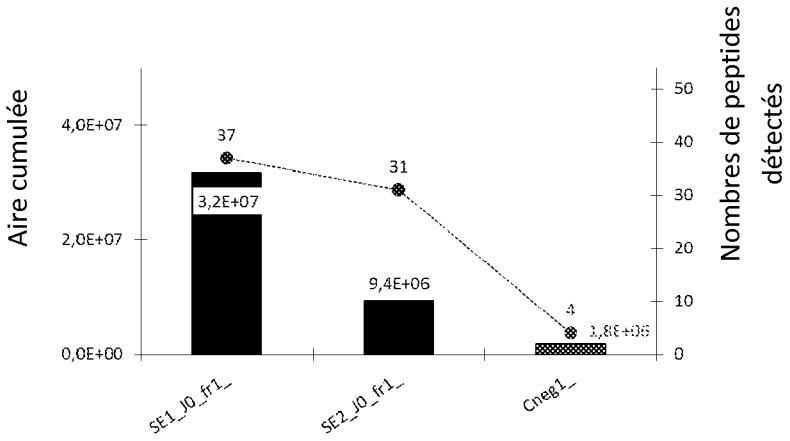


FIG. 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2014/050973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N1/40
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/290040 A1 (KANE JEFFREY F [US] ET AL) 27 November 2008 (2008-11-27) abstract figures 3a-3c,4 paragraphs [0032] - [0034], [0042] -----	1-18
X	US 2011/315641 A1 (CURRAN STEPHEN JOHN [GB] ET AL) 29 December 2011 (2011-12-29) abstract figures 10,11,12,15 paragraphs [0109] - [0115] -----	1-18
X	US 2004/038425 A1 (FERGUSON GARY WILLIAM [CA] ET AL) 26 February 2004 (2004-02-26) abstract figures 1, 6a, 6b paragraph [0060] -----	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 August 2014	20/08/2014

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Seifter, Achim

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2014/050973

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008290040 A1	27-11-2008	EP 2170483 A1	07-04-2010
		JP 2010537797 A	09-12-2010
		US 2008290040 A1	27-11-2008
		WO 2008144083 A1	27-11-2008
US 2011315641 A1	29-12-2011	AU 2009275287 A1	28-01-2010
		CA 2731154 A1	28-01-2010
		CN 102105226 A	22-06-2011
		EP 2323766 A2	25-05-2011
		JP 2011528980 A	01-12-2011
		KR 20110052570 A	18-05-2011
		US 2011315641 A1	29-12-2011
		WO 2010010355 A2	28-01-2010
US 2004038425 A1	26-02-2004	AU 2003258419 A1	11-03-2004
		CA 2495427 A1	04-03-2004
		EP 1535038 A1	01-06-2005
		US 2004038425 A1	26-02-2004
		WO 2004019006 A1	04-03-2004

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2014/050973

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. G01N1/40
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 2008/290040 A1 (KANE JEFFREY F [US] ET AL) 27 novembre 2008 (2008-11-27) abrégé figures 3a-3c,4 alinéas [0032] - [0034], [0042]	1-18
X	US 2011/315641 A1 (CURRAN STEPHEN JOHN [GB] ET AL) 29 décembre 2011 (2011-12-29) abrégé figures 10,11,12,15 alinéas [0109] - [0115]	1-18
X	US 2004/038425 A1 (FERGUSON GARY WILLIAM [CA] ET AL) 26 février 2004 (2004-02-26) abrégé figures 1, 6a, 6b alinéa [0060]	1-18

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
8 août 2014	20/08/2014

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Seifter, Achim

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2014/050973

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2008290040 A1	27-11-2008	EP 2170483 A1	07-04-2010
		JP 2010537797 A	09-12-2010
		US 2008290040 A1	27-11-2008
		WO 2008144083 A1	27-11-2008
US 2011315641 A1	29-12-2011	AU 2009275287 A1	28-01-2010
		CA 2731154 A1	28-01-2010
		CN 102105226 A	22-06-2011
		EP 2323766 A2	25-05-2011
		JP 2011528980 A	01-12-2011
		KR 20110052570 A	18-05-2011
		US 2011315641 A1	29-12-2011
		WO 2010010355 A2	28-01-2010
US 2004038425 A1	26-02-2004	AU 2003258419 A1	11-03-2004
		CA 2495427 A1	04-03-2004
		EP 1535038 A1	01-06-2005
		US 2004038425 A1	26-02-2004
		WO 2004019006 A1	04-03-2004