

(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
27 mars 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/025207 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/04,
C12M 1/12

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/03132

(22) Date de dépôt international :
13 septembre 2002 (13.09.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/11873 13 septembre 2001 (13.09.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
HEMOSYSTEM [FR/FR]; 45, cours Gouffe, F-13006
Marseille (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **HER-
MET, Jean-Pierre** [FR/FR]; 4ter, avenue Charles de
Gaulle, F-92100 Boulogne (FR). **BESSON-FAURE,
Isabelle** [FR/FR]; Villa les Troènes, Promenade Pierre
Blancard, F-13400 Aubagne (FR). **RIBAUT, Sébastien**
[FR/FR]; Résidence Chantecote, Avenue du Général de
Gaulle, F-13380 Plan de Cuques (FR). **GODFRIN, Yann**
[FR/FR]; 5, rue Emile Duport, F-69009 Lyon (FR). **MON-
NOT DES ANGLES, Anne** [FR/FR]; 6, quai Bellevue,
F-71100 Saint Rémy (FR).

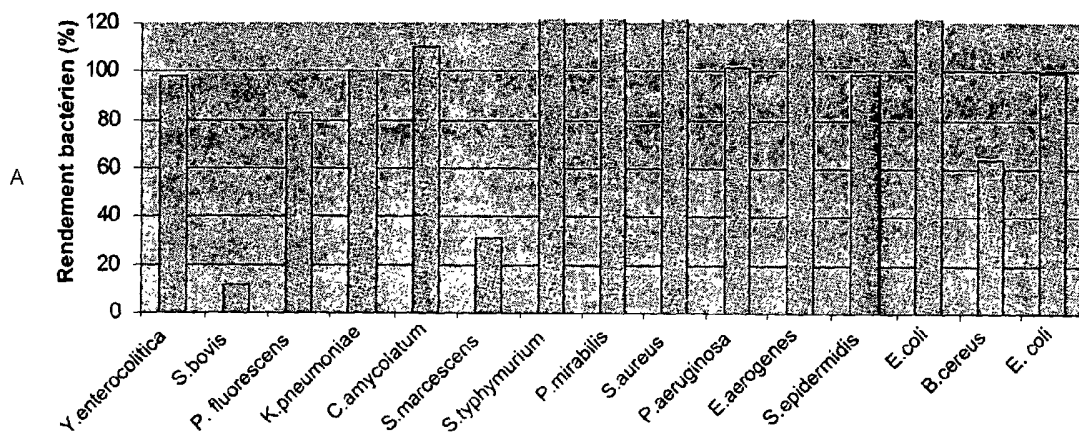
(74) Mandataires : **BREESE, Pierre** etc.; Breesé-Majerowicz,
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR CONCENTRATION AND DETECTION OF PATHOGENIC GERMS FROM BLOOD
PRODUCTS AND/OR THEIR DERIVATIVES

(54) Titre : DISPOSITIF ET PROCEDE DE CONCENTRATION ET DE DETECTION DE GERMES PATHOGENES A PARTIR
DE PRODUITS SANGUINS ET/OU DE LEURS DERIVES



A... BACTERIAL YIELD (%)

(57) Abstract: The invention concerns a device and a method for concentrating pathogenic germs potentially present in blood prod-
ucts or derivatives and for detecting said germs comprising the following steps: (a) subjecting a sample of said blood product to a
blood cell aggregating treatment, (b) eliminating the aggregates formed at step (a) by passing the treated sample over a first filter
allowing through the contaminating germs but not the cell aggregates, (c) selectively lysing the residual cells of the filtrate obtained
at step (b), (d) recuperating the contaminating germs by passing the lysate of step (c) over a second filter to detect the contaminating
germs possibly trapped.

[Suite sur la page suivante]



WO 03/025207 A1



HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un dispositif et une méthode de concentration de germes pathogènes éventuellement présents dans les produits sanguins ou dérivés, ainsi que la détection desdits germes comprenant les étapes suivantes, (a) on soumet un échantillon dudit produit sanguin à un traitement d'agrégation des cellules sanguines, (b) on élimine les agrégats formés à l'étape (a) par passage de l'échantillon traité sur un premier filtre laissant passer les germes contaminants mais pas les agrégats de cellules, (c) on lyse sélectivement les cellules résiduelles du filtrat obtenu à l'étape (b), (d) on récupère les germes contaminants par passage du lysat de l'étape (c) sur un second filtre laissant passer les débris cellulaires, et (e) on analyse le second filtre pour détecter les germes contaminants éventuellement retenus.

DISPOSITIF ET PROCEDE DE CONCENTRATION ET DE DETECTION DE GERMES PATHOGENES
A PARTIR DE PRODUITS SANGUINS ET/OU DE LEURS DERIVES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

On entend par agrégation, au sens de la présente invention, toute action conduisant à la formation d'agrégats cellulaires, et on entend par agrégat cellulaire

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

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

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

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

30 Le procédé de concentration de germes
pathogènes selon l'invention comporte éventuellement une
deuxième étape de réduction de la concentration des
populations des cellules majoritaires dans le sang, à
savoir les plaquettes et les globules rouges, consistant à
lyser les cellules isolées non agrégées lors de la première
étape d'agrégation.

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

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

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

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

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

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

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

Avantageusement le procédé de détection selon l'invention comprend l'addition d'un agent de marquage des germes contaminants, soit lors de l'agrégation de l'étape

(a), soit lors de la lyse de l'étape (c), soit directement sur le deuxième filtre lors de l'étape (e) d'analyse.

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

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

Le procédé de détection selon l'invention comprend également l'addition d'un agent de perméabilisation des germes contaminants, qui peut être ajouté à au moins l'une des étapes du procédé, soit lors de l'agrégation de l'étape (a), soit lors de la lyse de l'étape (c), soit directement sur le deuxième filtre lors de l'étape (e) d'analyse, soit à plusieurs d'entre elles.

A titre d'exemple d'agent de perméabilisation des germes contaminants, on peut citer le polyéthylènimine, le diacétate de chlorhexidine, le digluconate de chlorhexidine, l'acide d'éthylène diamine tetracétate (EDTA) seul ou en combinaison avec la nisine ainsi que les détergents de type N-Octyl β -D-glucopyranoside, SDS, Tween, triton, Brij, etc.

Selon un mode particulier de mise en œuvre du procédé de l'invention, les cellules sanguines du produit

sanguin sont des plaquettes ou des globules rouges ou un mélange de ceux-ci.

Selon un autre mode particulier de mise en œuvre du procédé de l'invention, les cellules sanguines du produit sanguin sont des plaquettes et le traitement d'agrégation de l'étape (a) comprend la mise en contact de l'échantillon avec une composition d'agrégation comprenant au moins l'un des agents d'agrégation choisis dans le groupe comprenant :

- un anticorps spécifique d'un antigène plaquettaire,

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

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

Avantageusement la concentration en anticorps de type CD9 spécifique d'un antigène plaquettaire dans la composition d'agrégation est comprise entre 0,5 µg/ml et 100 µg/ml, et de préférence elle est comprise entre 5 µg/ml et 40 µg/ml.

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

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

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

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

5 - 0,05 μ g/ml et 50 μ g/ml et de préférence entre 1 μ g/ml et 20 μ g/ml pour un agoniste de type collagène,

- 0,01 μ g/ml et 5 μ g/ml et de préférence entre 0,1 et 1 μ g/ml pour un agoniste du type thromboxane A₂,

10 - 0,005 mg/ml et 1 mg/ml et de préférence entre 0,05 et 0,5 mg/ml pour un agoniste du type PAF,

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

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

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

20 - 0,001 mM et 10 mM et de préférence entre 0,01 et 5 pour un agoniste du type acide arachidonique,

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

25 - 0,05 μ M et 100 μ M et de préférence entre 0,01 μ M et 50 μ M pour un agoniste du type sérotonine.

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

Selon un autre mode particulier de mise en œuvre du procédé de l'invention, le produit sanguin

comprend des globules rouges et le traitement d'agrégation de l'étape (a) comprend la mise en contact de l'échantillon avec une composition d'agglutination comprenant au moins un agent d'agglutination choisi parmi les lectines, le polyéthylènimine, le polyvinylpyrrolidone (PVP), les gélamines, les dextrans ou les polyéthylènes glycols (PEG).

Avantageusement lesdites lectines présentent une activité érythroagglutinine.

Tout préférentiellement les lectines sont choisies parmi les lectines de *Phaseolus vulgaris*, *Vicia sativa*, *Vicia faba* ou *Erythrina corallodendron*, *Lens culinaris*, *Phytolacca Americana*, *Triticum vulgaris*.

Avantageusement la concentration de lectine de type *Phaseolus vulgaris* dans la composition d'agglutination est comprise entre 10 µg/ml et 200 µg/ml.

Avantageusement la concentration de polyéthylènimine dans la composition d'agglutination, est comprise entre 0.1% (poids/volume) et 40% (poids/volume)

Tout préférentiellement lesdits dextrans sont choisis parmi le Dextran 70, Dextran 100, Dextran 500, etc.

Avantageusement la concentration de dextran dans la composition d'agglutination est comprise entre 0.1% (poids/volume) et 40% (poids/volume).

Tout préférentiellement lesdits PEG sont choisis parmi les PEG35, PEG, etc.

Avantageusement la concentration de PEG dans la composition d'agglutination est comprise entre 0.05% (poids/volume) et 40% (poids/volume).

Avantageusement la concentration de gélatine dans la composition d'agglutination est comprise entre 0.5% (poids/volume) et 40% (poids/volume).

5 Tout préférentiellement lesdites PVP sont choisies parmi les PVP-40, PVP-360, etc.

Avantageusement la concentration de PVP dans la composition d'agglutination est comprise entre 0.05% (poids/volume) et 40% (poids/volume).

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

15 De préférence, la solution de lyse est constituée d'un mélange de saponine, de Triton X100 et de Tween 20, et tout préférentiellement la solution de lyse comprend de la saponine à une concentration (exprimée en % poids/volume) comprise entre 0,005% et 0,5%, du Triton X100
20 à une concentration (exprimée en % poids/volume) comprise entre 0,001% et 0,5% du Tween 20 à une concentration comprise entre 0,01% et 1%, du N-Octyl β -D-glucopyranoside à une concentration comprise entre 0,1% et 0,5%.

25 Avantageusement, la perméabilisation des bactéries est réalisée avec une solution comprenant un ou plusieurs réactifs choisis dans le groupe comprenant : Chlorhexidine (digluconate, diacétate), Polyéthylènimine, N-Octyl β -D-glucopyranoside, Nisin seule ou en combinaison avec de l'EDTA.

30 De préférence, les agents perméabilisants sont utilisés pour la chlorhexidine à une concentration (poids/volume) comprise entre 0,0001% (poids/volume) et 0,1% (poids/volume), pour le polyéthylènimine une

concentration comprise entre 5 µg/ml et 120 µg/mL, pour le N-Octyl βD-glucopyranoside à une concentration comprise entre 0,1% (poids/volume) et 0,5% (poids/volume) et pour la Nisin entre 0.1 µg/mL et 0,5 µg/mL seule ou en combinaison avec de l'EDTA à une concentration comprise entre 1 mM et 10 mM.

Le procédé de l'invention peut être utilisé pour concentrer et détecter de nombreux germes contaminants des produits sanguins, parmi lesquels on peut citer des bactéries aérobies ou anaérobies, des moisissures, des levures, des spores de bactéries vivantes et/ou mortes.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Avantageusement, la connexion (6) étanche et stérile reliant la poche contenant le produit sanguin au

premier réservoir stérile est munie d'une valve anti-retour (7).

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

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

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

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

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

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

- La figure 2 illustre le dénombrement des plaquettes après agrégation en présence d'ADP pour 2 échantillons plaquettaires.

30 - La figure 3 montre le dénombrement des plaquettes en présence d'anticorps CD9 (clone SN4) pour 4 échantillons plaquettaires.

- La figure 4 montre les résultats du dénombrement des plaquettes en présence de doses

croissantes d'anticorps CD9 (clone 6B1) utilisé sur 3 mL de concentré plaquettaire.

- La figure 5 montre la courbe dose réponse obtenue en présence de concentrations croissantes d'anticorps CD9 (clone SN4).

- La figure 6 illustre l'agglutination de globules rouges en présence de la lectine *Phaseolus vulgaris* utilisée à une concentration de 200 µg/ml pour 3 échantillons de concentrés de globules rouges.

- La figure 7 montre les effets de la solution de lyse sur la récupération de différents germes pathogènes dans des cultures pures.

- La figure 8 montre l'effet de la solution de lyse sur la numération plaquettaire de deux échantillons de plaquettes.

- La figure 9 illustre l'effet de la lyse sur la numération érythrocytaire de deux échantillons différents de concentrés de globules rouges.

- La figure 10 illustre le dénombrement des bactéries *Escherichia coli* au sein d'un échantillon plaquettaire en utilisant le polyéthylène imine (PEI) en tant qu'agent perméabilisant pour augmenter la pénétration du marqueur.

- La figure 11 illustre l'effet de la concentration en N-octyl β D-glucopyranoside dans la solution de lyse sur des cultures de bactéries pures.

- La figure 12 illustre une mise en œuvre particulière du dispositif de concentration des germes pathogènes de l'invention, comprenant:

- un premier réservoir (1) étanche et stérile,
- un deuxième réservoir (2) étanche et stérile,
- un premier filtre stérile (3) placé entre le premier réservoir (1) et le deuxième réservoir (2),

- un deuxième filtre stérile (4) placé en aval du deuxième réservoir (2)

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

- des moyens de connexion (6) étanches et stériles pour relier la poche contenant le produit sanguin au premier réservoir (1).

- une valve anti-retour (7) placée dans la connexion (6) reliant la poche contenant le produit sanguin au premier réservoir 1.

- un système d'aspiration de l'échantillon (8).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

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

I.1 Agrégation des plaquettes.

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

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

Dans les travaux expérimentaux menés par la Demanderesse dans le cadre de la présente invention, des solutions de thrombine (référence T8885 Sigma) ont été préparées : à une concentration de 100 UI/ml lorsqu'elle est utilisée à raison de 10 UI/test et sous forme de solution diluée (100 µl de solution mère de thrombine additionnée de 900 µl de tampon PBS), lorsqu'elle est utilisée à raison de 1 UI/test.

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

- On place dans un tube 160 µl de concentré plaquettaire auxquels on ajoute 20 µl de tampon PBS et 20 µl de thrombine

- On agite manuellement les tubes durant 5 minutes à température ambiante.

- On ajoute audits tubes 800 µl de tampon PBS.

- On filtre le contenu des tubes sur un filtre de porosité 11 µm.

- On effectue des dilutions en série 1/20 à 1/10 à partir des filtrats.

- On filtre 100 µl de chaque dilution du filtrat sur une membrane CB04.

- On effectue un marquage estérasique.

- On compte les plaquettes éventuellement retenues sur la membrane.

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

Tableau 1

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

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

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

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

- On ajoute à 160 µl de concentré plaquettaire 20 µl de la suspension de *E.coli* et 20µl de thrombine.

- on agite manuellement le tube durant 5 minutes à température ambiante.

- On ajoute 800 µl de tampon PBS,

- On filtre à travers un filtre de porosité 11 µm,

- on effectue des dilutions en série : 1/20 et 1/10 et 1/10,

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

- On effectue un marquage estérasique

- On effectue la détection.

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

Tableau 2

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

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

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

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

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

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

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

- On y ajoute 500 μ l de tampons PBS,

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

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

- On effectue un marquage estérasique, et

- On effectue la détection.

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

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

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

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

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

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

- On y ajoute 500 µl de tampon PBS,

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

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

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

- On effectue un marquage estérasique,

- On effectue la détection.

Les germes pathogènes sontensemencés à une concentration élevée de manière à augmenter un possible effet de piégeage. L'ADP est ajouté aux plaquettes et aux bactéries à une concentration de 10 µM.

Tableau 3

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

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

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

Il est connu que l'anticorps CD9 induit l'activation des plaquettes et par conséquent leur agrégation. Les tests décrits ont été réalisés avec deux clones CD9, le clone SN4 (Ancel, ref 156-020, concentration 100 µg/ml) et le clone 6B1 (Hemosystem).

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

- Sur 400 µl de concentré plaquettaire on ajoute 50 µl de tampon PBS et 50 µl d'anticorps CD9,
- Les tubes sont agités manuellement durant 5 minutes à température ambiante
- On y ajoute 500 µl de tampon PBS,
- On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 µm
- On effectue des dilutions en série de 1/20 et 1/10 et 1/10,
- On filtre 100 µl de l'échantillon sur une membrane CB04,
- On effectue un marquage estérasique,
- On effectue la détection.

L'anticorps CD9 (clone SN4) a été utilisé en présence des plaquettes à une concentration finale de 10 µg/ml.

La figure 2 en annexe illustre l'agrégation des plaquettes obtenue en présence d'anticorps CD9 (clone SN4).

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

Méthode :

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

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

- On y ajoute 500 µl de tampon PBS,

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

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

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

- On effectue un marquage estérasique,

15 - On effectue la détection

Les figures 3 et 5 montrent respectivement les résultats du dénombrement des plaquettes agrégées en présence de doses croissantes d'anticorps CD9 (clone SN4) et la courbe dose-réponse ainsi obtenue.

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

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

30

Exemple 5 bis :

Afin d'évaluer la concentration optimale de l'anticorps CD9 (clone 6B1) nécessaire pour l'agrégation

plaquettaire, une expérience du type dose-réponse a été établie

Méthode :

- Sur 3 mL de concentré plaquettaire placés dans des tubes on ajoute différentes dilutions d'anticorps, avec des concentrations finales allant de 2,5 µg/mL à 40 µg/mL en anticorps CD9.

- Les tubes sont agités durant 15 minutes à température ambiante

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

- On effectue la numération des plaquettes comme décrit ci-dessus.

La figure 4 en annexe montre les résultats du dénombrement des plaquettes agrégées en présence de doses croissantes d'anticorps CD9 (clone 6B1).

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

Méthode :

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

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

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

- On y ajoute 500 µl de tampon PBS,

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

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

- On filtre 100 µl de l'échantillon sur une membrane CB04
- On effectue un marquage estérasiq.
- On effectue la détection

5

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

Tableau 4

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

10

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

15

I.2. Agglutination de globules rouges.

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

20

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

- Phaseolus vulgaris PHA-E
- Vicia Sativa

Exemple 1 : Agglutination de globules rouges avec des lectines.

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

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

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

Méthode :

- 400 µl de globules rouges sont placés dans des tubes auxquels on ajoute 50 µl de PBS et 50 µl de Phaseolus vulgaris,
15

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

- On y ajoute 500 µl de tampon PBS,

- On effectue une filtration sur un filtre de porosité 5 µm,
20

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

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

25 - On effectue la détection

La figure 6 en annexe montre l'agglutination des globules rouges obtenue en présence de Phaseolus vulgaris.

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

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

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

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

Méthode

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

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

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

Tableau 5

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

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

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

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

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

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

Méthode

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

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

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

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

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

5

- On effectue la détection.

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

10

Tableau 6

Souche	Contrôle	Échantillon lysé	% de récupération
<i>E. coli</i>	132 145	153 119	98
<i>Bacillus cereus</i>	465 572	61 54	11
<i>E. coli</i>	52 54	44 44	83
<i>Staph. epidermidis</i>	2952 3069	3034 3020	101
<i>E. aerogenes</i>	841 802	880 925	110
<i>Ps. aeruginosa</i>	261 215	82 66	31
<i>Staph. aureus</i>	105 94	126 122	125
<i>P. mirabilis</i>	729 906	1129 1151	139
<i>S. typhimurium</i>	608 600	820 787	133
<i>Serratia marcescens</i>	1848 1775	1826 1860	102
<i>C. amycolatum</i>	1103 1167	1512 2035	156
<i>K. pneumoniae</i>	72 82	79 73	99
<i>P. fluorescens</i>	4039 3951	4873 5105	125
<i>Streptococcus bovis</i>	3074 2939	1848 1978	64
<i>Y. enterocolitica</i>	10218 10321	9888 10526	99

Ces résultats sont illustrés sur la figure 7 en annexe.

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

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

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

Méthode

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

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

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

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

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

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

- La membrane est balayée avec l'Analyseur.

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

Tableau 7

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

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

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

Exemple 2b : Effet de la formulation de la solution de lyse sur des cultures de bactéries pures.

Méthode

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

- Après détermination du nombre de bactéries par marquage estérasique, 3000 bactéries sont inoculées dans 3 mL de PBS

- Les 3mL sont traités avec la solution de lyse (NOG 0.25% à 2%) pendant 20 minutes

- La totalité de l'échantillon est filtrée sur une membrane CB04

- Le dénombrement est effectué en cytométrie en phase solide

Les résultats obtenus sont illustrés figure 11 en annexe.

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

Méthode

- Un millilitre de globules rouges est dilué dans 9 ml de solution de lyse ou 9 ml de PBS (contrôle).
- la lyse est effectuée durant 15 minutes à température ambiante
- les échantillons lysés ou non sont analysés à l'aide d'un compteur cellulaire.

La figure 9 montre les résultats obtenus sur la préparation de globules rouges lysée par rapport à une préparation de globules rouges non lysée.

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

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

Méthode:

- Un millilitre de plaquettes est dilué dans 9 ml de solution de lyse
- la lyse est effectuée durant 15 minutes à température ambiante
- Des dilutions en série (1/10) ont été effectuées dans du tampon PBS jusqu'à 10^{-5}
- 100 μ l de l'échantillon sont filtrés sur une membrane CB04.
- les microorganismes sont marqués avec un substrat estérasique
- la membrane est balayée avec l'analyseur.

La figure 8 en annexe illustre les résultats de la lyse obtenue avec différents échantillons de plaquettes.

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

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

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

2) La Lyse spécifique des cellules du produit sanguin.

Exemple 1: Séparation spécifique des plaquettes

15 Méthode :

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

20 La première étape d'agrégation est effectuée comme suit :

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

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

La deuxième étape de lyse est alors effectuée :

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

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

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

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

- On effectue un marquage des bactéries et des plaquettes avec un substrat estérasique (Annexe 1)
- On dénombre les bactéries et les plaquettes avec l'Analyseur.

5

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

10

Tableau 8

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

Exemple 2. Séparation spécifique des globules rouges.

15

Méthode :

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

20

L'étape d'agglutination est effectuée comme suit :

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

25

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

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

La deuxième étape de lyse est alors effectuée :

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

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

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

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

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

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

Le tableau 9 ci-dessous montre les résultats obtenus avec le dénombrement des bactéries effectué après l'étape d'agglutination des globules rouges avec la lectine suivie de l'étape de lyse.

Tableau 9

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

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

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

5

IV. AGENTS DE MARQUAGE

Exemple 1. Substrat estérasique ChemChrome V6

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

a) Préparation

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

15

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

b) Utilisation

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

20

Distribuer 500 µl de la solution de marquage sur le tampon.

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

25

Placer la membrane sur le tampon.

Incuber durant 15 minutes à 37°C.

Exemple 2. Anticorps marqué.

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

30

- Prélever 90 µl d'une dilution de l'échantillon,

- Ajouter 10 µl de l'anticorps anti-glycophorine-PE,
- Vortexer et incuber durant 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière,
- 5 - Ajouter 900 µl de tampon PBS,
- Placer la membrane CB04 dans la rampe de filtration,
- Filtrer sous vide 100 µl de la solution à analyser,
- 10 - Analyser la membrane dans l'Analyseur en inversant les câbles primaire et tertiaire de l'Analyseur.

Exemple 3 : Intérêt de l'ajout d'un agent de perméabilisation des bactéries pour améliorer la pénétration du marqueur.

Méthode

- Les souches sont conservées dans un tube de 9 ml de bouillon tryptone soja et incubées à 37 °C durant 18-24 heures.
- 20 - Après détermination du nombre de bactéries par marquage estérasique, 3000 bactéries sont inoculées dans 3 mL de concentré plaquettaire
- Les 3mL sont traités avec 1 ml de la solution d'agrégation (CD9 :clone 6B1: 30µg/mL, Picogreen 1/2000, PEI 40µg/mL à 80µg/mL) durant 40 minutes
- 25 - L'échantillon est filtré au travers d'un filtre de porosité 5 µm
- L'échantillon est incubé dans la solution de lyse (Chlorhexidine $5 \cdot 10^{-3}$ %, NOG 0,5%, Nisin 0,2 µg/mL, EDTA 5 mM) pendant 20 minutes
- 30 - La totalité de l'échantillon est filtrée sur une membrane CB04

- Le dénombrement est effectué au moyen d'un analyseur cytomètre en phase solide

5 V. CONCLUSIONS

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

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

1) Etape d'agrégation avec par exemple un anticorps activateur plaquettaire tel que CD9,

15 2) Etape de lyse cellulaire avec une combinaison des détergents tels que saponine, Tween 20 et Triton X 100.

En ce qui concerne les concentrés de globules rouges :

20 1) Etape d'agglutination avec une lectine telle que par exemple Phaseolus vulgaris,

2) Etape de lyse cellulaire avec une combinaison de détergents tels que saponine, Tween 20 et Triton X 100.

25 Le marquage et la perméabilisation des germes pathogènes pouvant intervenir indistinctement lors de l'étape d'agrégation, lors de l'étape de lyse ou directement sur les germes concentrés sur le dernier filtre
30 avant analyse.

REVENDICATIONS

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

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

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

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

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

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

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

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

4) Procédé selon les revendications 2 ou 3, caractérisé en ce qu'il comprend l'addition d'un agent de perméabilisation des germes contaminants, à au moins l'une des étapes (a), (c), ou (e).

5

5) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'agent de perméabilisation est choisi parmi le groupe comprenant : le polyéthylènimine, le diacétate de chlorhexidine, le digluconate de chlorhexidine, l'acide d'éthylène diamine tetracétate (EDTA) seul ou en combinaison avec la nisine, un détergent ou un mélange de ceux-ci.

10

6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le détergent est choisi parmi le groupe comprenant : N-Octyl β -D-glucopyranoside, SDS, Tween, triton, Brij, ou un mélange de ceux-ci.

15

7) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que l'agent de marquage des germes pathogènes est une solution de marquage choisie parmi le groupe comprenant un substrat estérasique tel que le ChemChrome V6, un anticorps marqué ou un marqueur d'acides nucléiques.

20

25

8) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 7, caractérisé en ce que l'agent de marquage comprend un marqueur fluorescent ou un agent couplé à un fluorochrome ou à un enzyme permettant la dégradation d'un substrat rendu ainsi fluorescent.

30

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la fluorescence est détectée au moyen d'une excitation laser.

10) Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les cellules sanguines du produit sanguin sont des plaquettes ou des globules rouges ou un mélange de ceux-ci.

11) Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le produit sanguin comprend des plaquettes et en ce que le traitement d'agrégation de l'étape (a) comprend la mise en contact de l'échantillon avec une composition d'agrégation comprenant au moins l'un des agents d'agrégation choisis dans le groupe comprenant :

- un anticorps spécifique d'un antigène plaquettaire,

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

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

12) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la concentration en anticorps de type CD9 dans la composition d'agrégation est comprise entre 0,5 µg/ml et 50 µg/ml, et de préférence entre 5 µg/ml et 40 µg/ml.

13) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la concentration en agoniste fort dans la composition d'agrégation est comprise entre :

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

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

5 - 1 nM et 500 nM et de préférence entre 10 nM et 300 nM pour un agoniste de type trypsine,

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

10 - 0,01 μ g/ml et 5 μ g/ml et de préférence entre 0,1 μ g/ml et 1 μ g/ml pour un agoniste du type thromboxane A₂,

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

15 - 0,1 μ M et 100 μ M et de préférence entre 1 μ M et 20 μ M pour un agoniste du type ionophore A23187.

14) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la concentration en agoniste faible dans la composition d'agrégation est comprise entre :

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

25 - 0,001 mM et 10 mM et de préférence entre 0,01 mM et 5 mM pour un agoniste du type acide arachidonique,

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

30 - 0,05 μ M et 100 μ M et de préférence entre 0,01 μ M et 50 μ M pour un agoniste du type sérotonine.

15) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'anticorps est choisi parmi: un

anticorps anti-CD9, anti-CD32, anti-PTA1, anti-D42, anti-GpIIb/IIIa ou anti-GpIV.

5 16) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que le produit sanguin comprend des globules rouges et en ce que le traitement d'agrégation de l'étape (a) comprend la mise en contact de l'échantillon avec une composition d'agglutination comprenant au moins un agent
10 d'agglutination choisi parmi les lectines, le polyéthylènimine, la polyvinylpyrrolidone (PVP), les gélatines, les dextrans ou les polyéthylène glycols (PEG).

15 17) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que les lectines présentent une activité érythroagglutinine.

20 18) Procédé selon les revendications 16 ou 17, caractérisé en ce que les lectines sont choisies parmi les lectines de *Phaseolus vulgaris*, *Vicia sativa*, *Vicia faba* ou *Erythrina corallodendron*, *Lens culinaris*, *Phytolacca Americana*, *Triticum vulgaris*.

25 19) Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que la concentration de lectine de *Phaseolus vulgaris* dans la composition d'agglutination est comprise entre 10 µg/ml et 800 µg/ml.

30 20) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la concentration de polyéthylènimine dans la composition d'agglutination est comprise entre 0,1% (poids/volume) et 40% (poids/volume) de préférence entre 20% (poids/volume) et 40% (poids/volume).

21) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la Polyvinylpyrrolidone (PVP) est choisie parmi le groupe comprenant du PVP-40 et du PVP-360 et utilisée de préférence à une concentration comprise entre 0,1% (poids/volume) et 40% (poids/volume), et tout
5 préférentiellement entre 4% (poids/volume) et 20% (poids/volume).

22) Procédé selon la revendications 16, caractérisé en ce que la gélatine dans la composition d'agglutination est utilisée de préférence à une concentration comprise entre 0,5% (poids/volume) et 40% (poids/volume), et tout préférentiellement entre 40% (poids/volume) et 20% (poids/volume).
10

23) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le dextran dans la composition d'agglutination est choisi parmi le groupe comprenant : Dextran 70, Dextran 100, et Dextran 500, utilisé de préférence à une concentration comprise entre 0,1% (poids/volume) et 40% (poids/volume), et tout
20 préférentiellement entre 4% (poids/volume) et 20% (poids/volume).

24) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le polyéthylène glycol est choisi parmi le groupe comprenant : PEG8, PEG17, PEG35, utilisé de préférence à une concentration comprise entre 0,05% (poids/volume) et 40% (poids/volume) et tout
25 préférentiellement entre 20% (poids/volume) et 40% (poids/volume).
30

25) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la lyse

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

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

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

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

29) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les germes contaminants sont des bactéries aérobies ou anaérobies, des moisissures, des levures ou des spores de bactéries vivantes et/ou mortes, en ce que la taille des pores du premier filtre est comprise entre 2 μ m et 20 μ m, et en ce que la taille des pores du second filtre est comprise entre 0,2 μ m et 2 μ m.

30) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 29, caractérisé en ce que la détection des germes contaminants de l'étape (e) est réalisée dans un dispositif clos.

31) Dispositif pour la concentration de germes contaminants éventuellement présents dans un produit sanguin comprenant des cellules sanguines, susceptible d'être mis en œuvre dans un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 30, caractérisé en ce qu'il comprend :

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

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

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

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

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

32) Dispositif selon la revendication 31 caractérisé en ce qu'il comprend une connexion (6) étanche et stérile pour relier la poche contenant le produit sanguin au premier réservoir stérile.

33) Dispositif selon la revendication 32, caractérisé en ce que ladite connexion étanche et stérile reliant la poche contenant le produit sanguin au premier réservoir stérile est munie d'une valve (7) anti-retour.

34) Dispositif selon les revendications 31 ou 33 caractérisé en ce qu'il comprend des moyens d'échantillonnage d'un volume déterminé du produit sanguin directement à partir d'une poche de stockage dudit produit vers ledit premier réservoir.

35) Dispositif selon les revendications 36 ou 34, caractérisé en ce que le premier réservoir stérile est muni d'un système d'aspiration de l'échantillon (8).

36) Dispositif selon la revendication 35, caractérisé en ce que le système d'aspiration est un piston.

37) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 31 à 36, caractérisé en ce que le deuxième filtre est inclus dans un support de membrane composé de 2 parties pouvant être dissociées permettant de récupérer le filtre.

38) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 31 à 37, caractérisé en ce qu'il est clos et stérile.

FIGURE 1

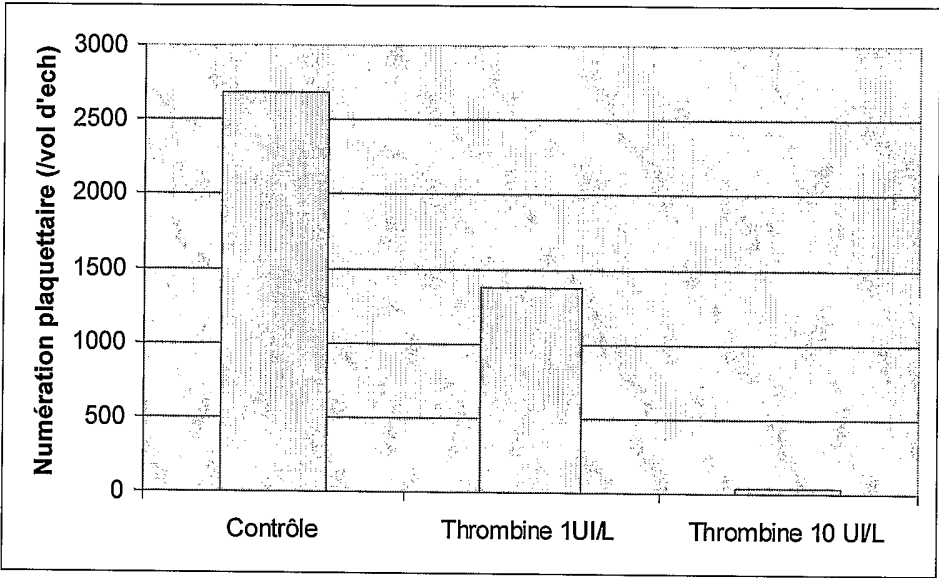
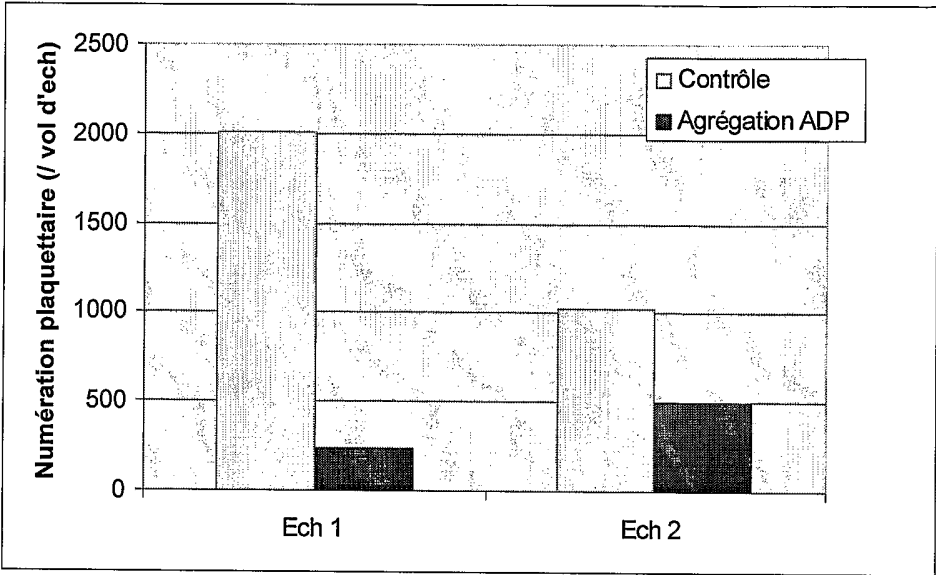


FIGURE 2



3/12

FIGURE 3

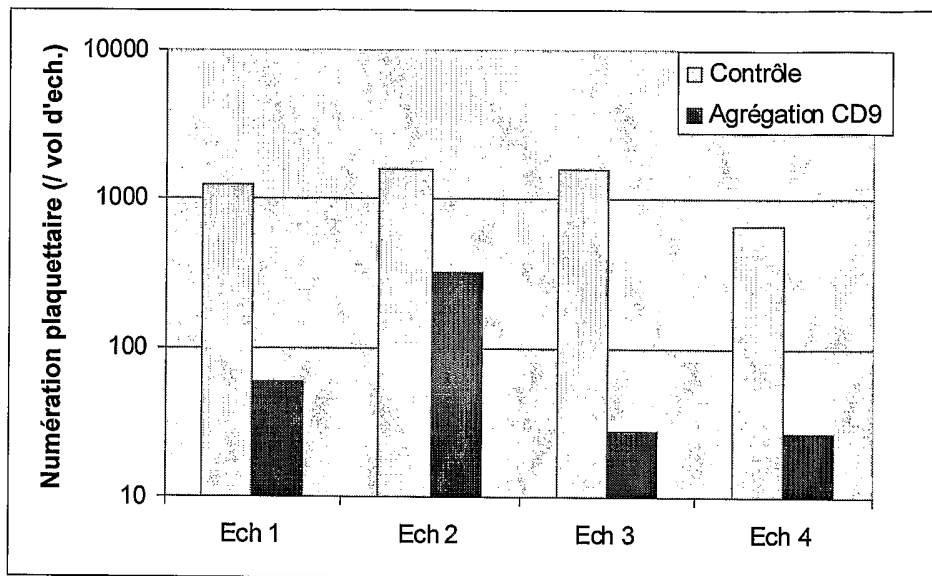
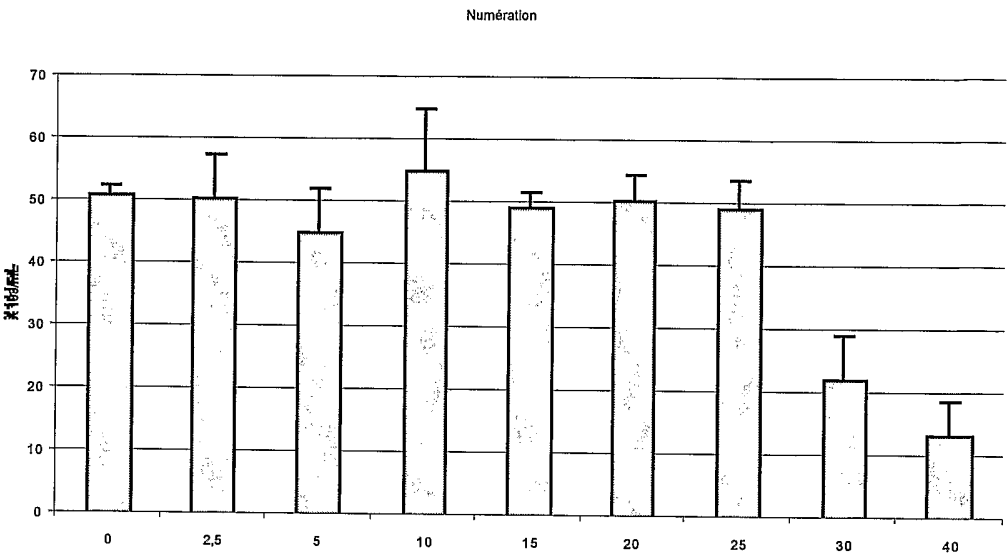
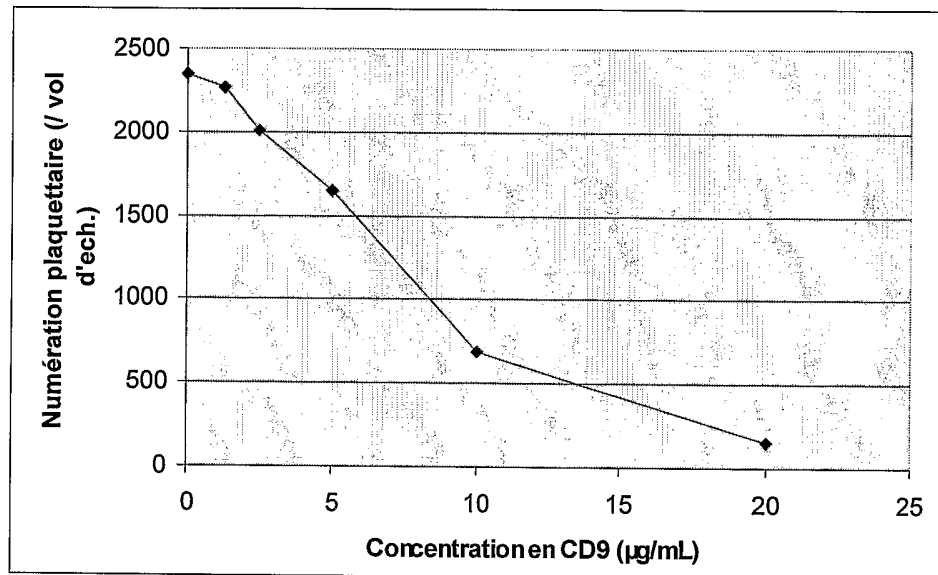


FIGURE 4



5/12

FIGURE 5



6/12

FIGURE 6

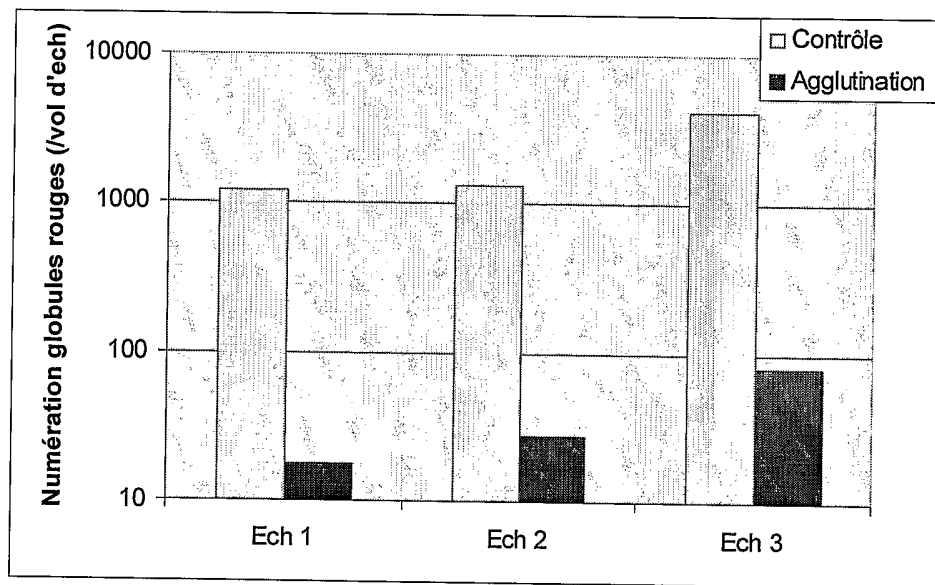


FIGURE 7

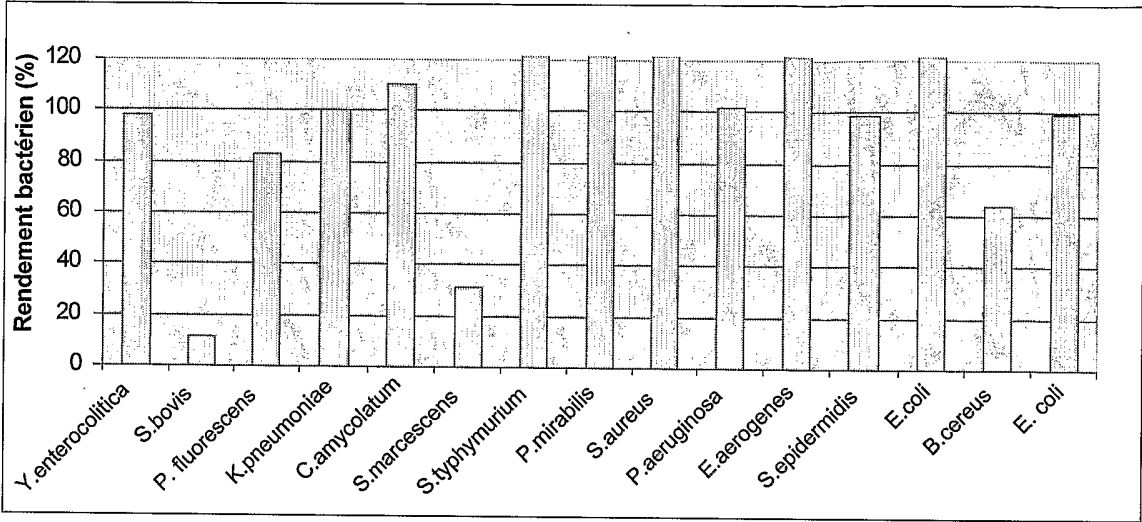


FIGURE 8

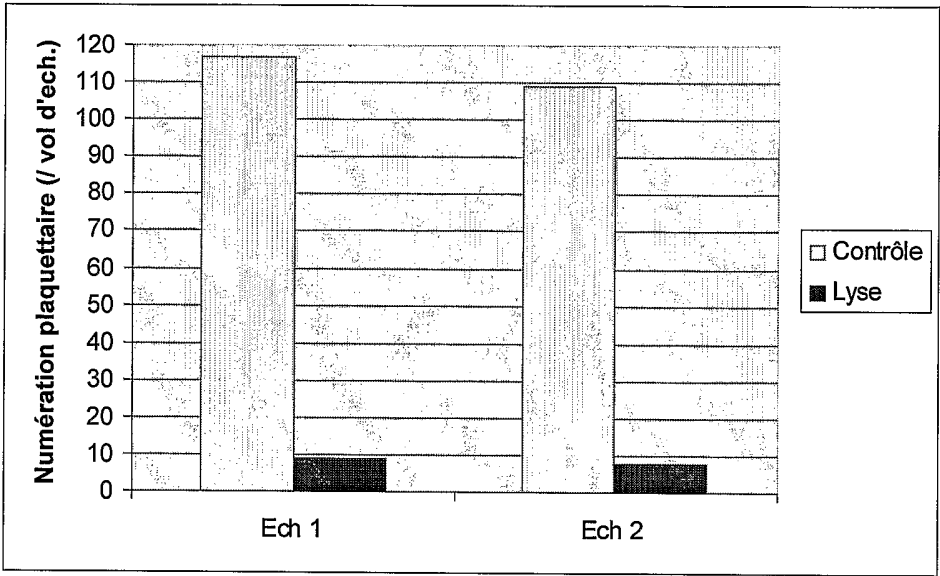
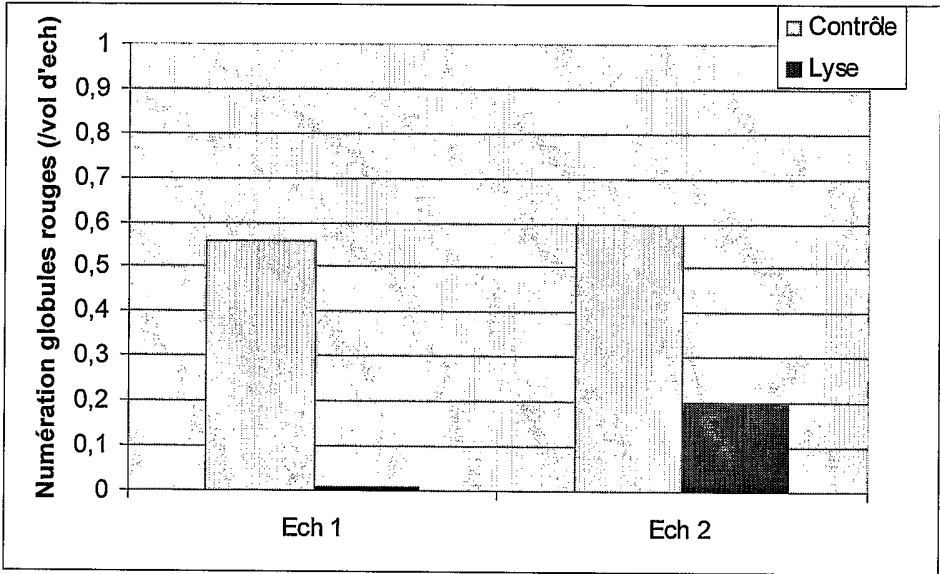


FIGURE 9



10/12

FIGURE 10

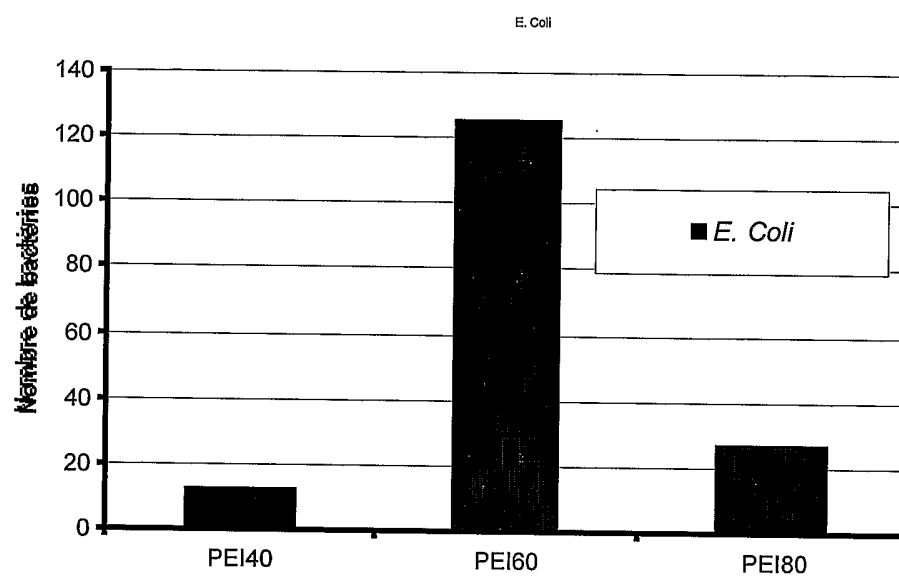


FIGURE 11

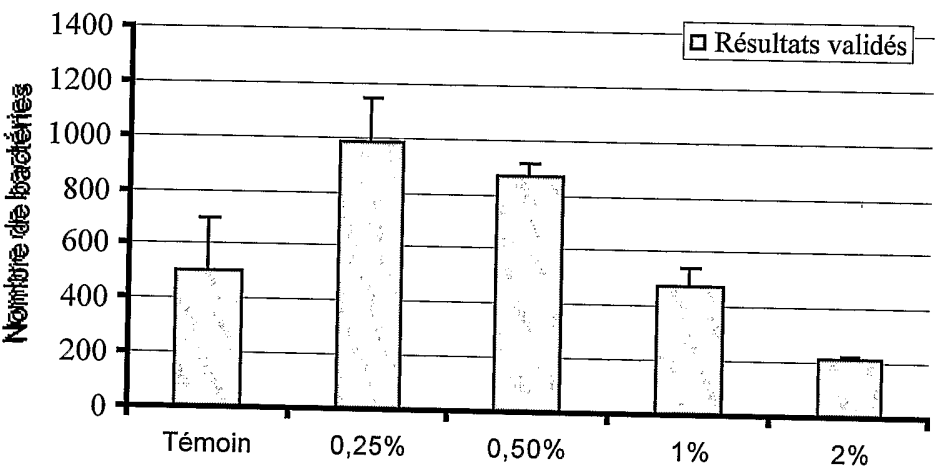
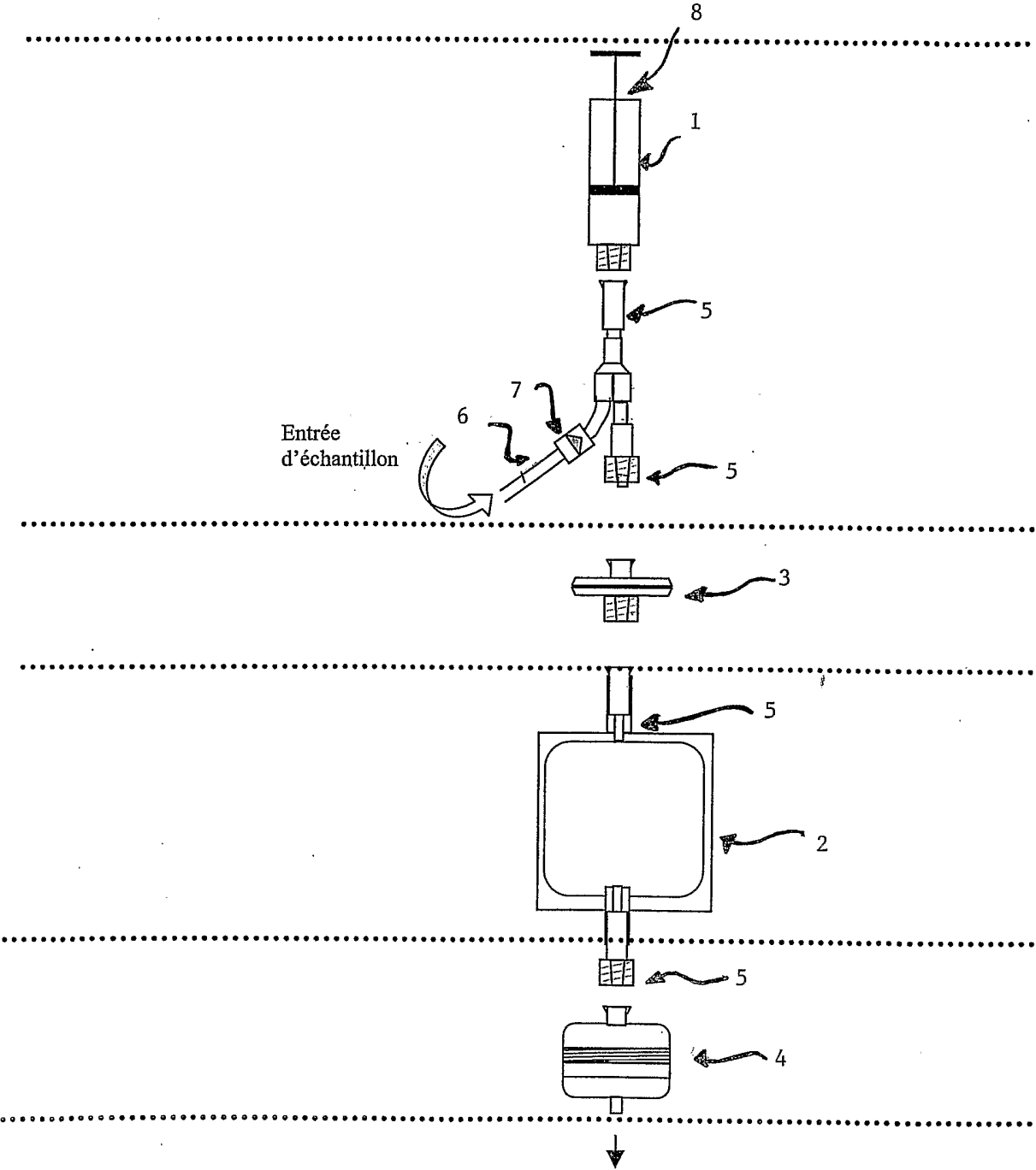


FIGURE 12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/03132

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/04 C12M1/12

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)
IPC 7 C12Q C12M 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 practical, search terms used)

PAJ, WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 198 01 090 A (BALES UWE ;HAASE GERHARD (DE); SCHNITZLER NORBERT (DE)) 15 July 1999 (1999-07-15) claims	1-38
Y	US 3 635 798 A (KIRKHAM WILLIAM R ET AL) 18 January 1972 (1972-01-18) page 2, line 8-24 column 3, line 19-23 column 3, line 48 -column 4 column 6, line 39-56	1-38
Y	WO 01 09370 A (MILLER STEFAN ;PROFOS GMBH (DE)) 8 February 2001 (2001-02-08) column 2, line 8-24 column 3, line 19-23 column 3, line 48 -column 4 column 6, line 39-56	4-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in 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 document 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.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 2002

Date of mailing of the international search report

03/01/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vadot-Van Geldre, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/03132

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 89 04372 A (BERG JAMES D) 18 May 1989 (1989-05-18) abstract page 6 -page 7 ----	4-9
Y	US 5 766 552 A (DOSHI SONAL R ET AL) 16 June 1998 (1998-06-16) column 6, line 19-22; tables 1,2 column 11, line 1-10 ----	16-24
Y	US 5 302 512 A (PERNELLE MICHEL) 12 April 1994 (1994-04-12) column 4, line 26-36 ----	15-24
A	US 5 316 731 A (SCHRENK W JUERGEN ET AL) 31 May 1994 (1994-05-31) column 5, line 10-50 ----	1-38
A	US 5 981 294 A (ALLEN MICHAEL P ET AL) 9 November 1999 (1999-11-09) column 3, line 30-43 column 5, line 14-17 -----	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/03132

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19801090	A	15-07-1999	DE 19801090 A1	15-07-1999
US 3635798	A	18-01-1972	NONE	
WO 0109370	A	08-02-2001	AU 6686000 A	19-02-2001
			WO 0109370 A2	08-02-2001
			DE 10036931 A1	23-05-2001
			EP 1198713 A2	24-04-2002
			US 2002127547 A1	12-09-2002
WO 8904372	A	18-05-1989	AT 117378 T	15-02-1995
			AT 147790 T	15-02-1997
			AU 2602488 A	01-06-1989
			DE 3852825 D1	02-03-1995
			DE 3852825 T2	18-05-1995
			DE 3855762 D1	27-02-1997
			DE 3855762 T2	07-05-1997
			EP 0386051 A1	12-09-1990
			EP 0574977 A1	22-12-1993
			WO 8904372 A1	18-05-1989
			US 5518894 A	21-05-1996
			US 5292644 A	08-03-1994
US 5766552	A	16-06-1998	US 5652148 A	29-07-1997
			AU 6708694 A	08-11-1994
			WO 9424555 A1	27-10-1994
			US 5660798 A	26-08-1997
US 5302512	A	12-04-1994	FR 2676123 A1	06-11-1992
			AT 112392 T	15-10-1994
			CA 2067584 A1	03-11-1992
			DE 69200460 D1	03-11-1994
			DE 69200460 T2	11-05-1995
			EP 0512896 A1	11-11-1992
			ES 2061324 T3	01-12-1994
			JP 3186831 B2	11-07-2001
			JP 5264543 A	12-10-1993
US 5316731	A	31-05-1994	AT 149880 T	15-03-1997
			AU 667760 B2	04-04-1996
			AU 5457794 A	08-06-1994
			CA 2146257 A1	26-05-1994
			DE 69308875 D1	17-04-1997
			DE 69308875 T2	03-07-1997
			DK 669855 T3	15-09-1997
			EP 0669855 A1	06-09-1995
			ES 2099984 T3	01-06-1997
			GR 3023338 T3	29-08-1997
			JP 3286919 B2	27-05-2002
			JP 8511957 T	17-12-1996
			WO 9411107 A1	26-05-1994
US 5981294	A	09-11-1999	AU 1126197 A	19-06-1997
			CA 2238926 A1	05-06-1997
			EP 0891544 A1	20-01-1999
			JP 2000501183 T	02-02-2000
			WO 9720207 A1	05-06-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de Internationale No
PCT/FR 02/03132

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12Q1/04 C12M1/12

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)
CIB 7 C12Q C12M 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 réalisable, termes de recherche utilisés)

PAJ, WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	DE 198 01 090 A (BALES UWE ;HAASE GERHARD (DE); SCHNITZLER NORBERT (DE)) 15 juillet 1999 (1999-07-15) revendications ----	1-38
Y	US 3 635 798 A (KIRKHAM WILLIAM R ET AL) 18 janvier 1972 (1972-01-18) page 2, ligne 8-24 colonne 3, ligne 19-23 colonne 3, ligne 48 -colonne 4 colonne 6, ligne 39-56 ----	1-38
Y	WO 01 09370 A (MILLER STEFAN ;PROFOS GMBH (DE)) 8 février 2001 (2001-02-08) colonne 2, ligne 8-24 colonne 3, ligne 19-23 colonne 3, ligne 48 -colonne 4 colonne 6, ligne 39-56 ----- -/--	4-9

☒ 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
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 décembre 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/01/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Vadot-Van Geldre, E

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 89 04372 A (BERG JAMES D) 18 mai 1989 (1989-05-18) abrégé page 6 -page 7 ---	4-9
Y	US 5 766 552 A (DOSHI SONAL R ET AL) 16 juin 1998 (1998-06-16) colonne 6, ligne 19-22; tableaux 1,2 colonne 11, ligne 1-10 ---	16-24
Y	US 5 302 512 A (PERNELLE MICHEL) 12 avril 1994 (1994-04-12) colonne 4, ligne 26-36 ---	15-24
A	US 5 316 731 A (SCHRENK W JUERGEN ET AL) 31 mai 1994 (1994-05-31) colonne 5, ligne 10-50 ---	1-38
A	US 5 981 294 A (ALLEN MICHAEL P ET AL) 9 novembre 1999 (1999-11-09) colonne 3, ligne 30-43 colonne 5, ligne 14-17 -----	1-38

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Numéro de l'acte International No

PCT/FR 02/03132

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 19801090	A	15-07-1999	DE 19801090 A1	15-07-1999
US 3635798	A	18-01-1972	AUCUN	
WO 0109370	A	08-02-2001	AU 6686000 A	19-02-2001
			WO 0109370 A2	08-02-2001
			DE 10036931 A1	23-05-2001
			EP 1198713 A2	24-04-2002
			US 2002127547 A1	12-09-2002
WO 8904372	A	18-05-1989	AT 117378 T	15-02-1995
			AT 147790 T	15-02-1997
			AU 2602488 A	01-06-1989
			DE 3852825 D1	02-03-1995
			DE 3852825 T2	18-05-1995
			DE 3855762 D1	27-02-1997
			DE 3855762 T2	07-05-1997
			EP 0386051 A1	12-09-1990
			EP 0574977 A1	22-12-1993
			WO 8904372 A1	18-05-1989
			US 5518894 A	21-05-1996
			US 5292644 A	08-03-1994
US 5766552	A	16-06-1998	US 5652148 A	29-07-1997
			AU 6708694 A	08-11-1994
			WO 9424555 A1	27-10-1994
			US 5660798 A	26-08-1997
US 5302512	A	12-04-1994	FR 2676123 A1	06-11-1992
			AT 112392 T	15-10-1994
			CA 2067584 A1	03-11-1992
			DE 69200460 D1	03-11-1994
			DE 69200460 T2	11-05-1995
			EP 0512896 A1	11-11-1992
			ES 2061324 T3	01-12-1994
			JP 3186831 B2	11-07-2001
			JP 5264543 A	12-10-1993
US 5316731	A	31-05-1994	AT 149880 T	15-03-1997
			AU 667760 B2	04-04-1996
			AU 5457794 A	08-06-1994
			CA 2146257 A1	26-05-1994
			DE 69308875 D1	17-04-1997
			DE 69308875 T2	03-07-1997
			DK 669855 T3	15-09-1997
			EP 0669855 A1	06-09-1995
			ES 2099984 T3	01-06-1997
			GR 3023338 T3	29-08-1997
			JP 3286919 B2	27-05-2002
			JP 8511957 T	17-12-1996
			WO 9411107 A1	26-05-1994
US 5981294	A	09-11-1999	AU 1126197 A	19-06-1997
			CA 2238926 A1	05-06-1997
			EP 0891544 A1	20-01-1999
			JP 2000501183 T	02-02-2000
			WO 9720207 A1	05-06-1997