



(11) **EP 1 305 115 B1**

(12) **FASCICULE DE BREVET EUROPEEN**

(45) Date de publication et mention
de la délivrance du brevet:
09.11.2011 Bulletin 2011/45

(21) Numéro de dépôt: **01956628.0**

(22) Date de dépôt: **20.07.2001**

(51) Int Cl.:
B01L 7/00 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)

(86) Numéro de dépôt international:
PCT/FR2001/002385

(87) Numéro de publication internationale:
WO 2002/009877 (07.02.2002 Gazette 2002/06)

(54) **DISPOSITIF POUR L'AMPLIFICATION EN CHAÎNE THERMO-DEPENDANTE DE SEQUENCES
D'ACIDES NUCLEIQUES CIBLES**

VORRICHTUNG ZUR PCR-AMPLIFIZIERUNG VON ZIEL-DNA-SEQUENZEN

DEVICE FOR HEAT-DEPENDENT CHAIN AMPLIFICATION OF TARGET NUCLEIC ACID
SEQUENCES

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR**

(30) Priorité: **28.07.2000 FR 0010029**

(43) Date de publication de la demande:
02.05.2003 Bulletin 2003/18

(60) Demande divisionnaire:
10177401.6 / 2 269 738

(73) Titulaire: **Pall Genedisc Technologies
35170 Bruz (FR)**

(72) Inventeur: **FESTOC, Gabriel
F-35000 Rennes (FR)**

(74) Mandataire: **Hoeger, Stellrecht & Partner
Patentanwälte
Uhlandstrasse 14c
70182 Stuttgart (DE)**

(56) Documents cités:
**EP-A2- 1 696 238 WO-A-00/33962
WO-A-98/49340 WO-A2-01/28684
DE-A- 19 810 499 DE-A- 19 852 835
GB-A- 1 572 596 US-A- 5 446 263
US-A- 6 124 138**

EP 1 305 115 B1

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la publication de la mention de la délivrance du brevet européen au Bulletin européen des brevets, toute personne peut faire opposition à ce brevet auprès de l'Office européen des brevets, conformément au règlement d'exécution. L'opposition n'est réputée formée qu'après le paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

Description

[0001] La présente invention concerne le domaine de la génétique.

[0002] Plus précisément, la présente invention concerne un dispositif pour l'amplification de séquences nucléiques cibles, des cartouches réactionnelles utilisables dans ce dispositif, et des modes d'utilisation de ce dispositif.

[0003] La présente invention a notamment pour objectif de permettre la détection et, le cas échéant, la quantification en temps réel, de séquences d'acide nucléique cibles dans un ou plusieurs échantillons.

[0004] La détection de séquences nucléiques cibles est une technique de plus en plus utilisée dans de nombreux domaines, et l'éventail des applications de cette technique est appelé à s'étendre au fur et à mesure qu'elle deviendra plus fiable, plus économique et plus rapide. Ainsi, en santé humaine, la détection de certaines séquences d'acide nucléique permet dans certains cas un diagnostic fiable et rapide d'infections virales ou bactériennes. De même, la détection de certaines particularités génétiques peut permettre d'identifier des susceptibilités à certaines maladies, ou d'établir un diagnostic précoce de maladies génétiques ou néoplasiques. La détection de séquences nucléiques cibles est aussi utilisée dans l'industrie agroalimentaire, notamment pour assurer la traçabilité des produits, pour détecter la présence d'organismes génétiquement modifiés et les identifier, ou pour effectuer un contrôle sanitaire des aliments.

[0005] Les procédés de détection basés sur les acides nucléiques font quasi systématiquement intervenir une réaction d'hybridation moléculaire entre une séquence nucléique cible et une ou plusieurs séquences nucléiques complémentaires de ladite séquence cible. Ces procédés présentent de nombreuses variantes comme les techniques connues de l'homme de métier sous les expressions "techniques de transfert" (*blot*, *dot blot*, *Southern blot*, *Restriction Fragment Length Polymorphism*, etc.), ou encore comme les systèmes miniaturisés sur lesquels sont préfixées les séquences complémentaires des séquences cibles ("biopuces"). Dans le cadre de ces techniques, les séquences nucléiques complémentaires sont généralement appelées sondes. Une autre variante, qui peut constituer en soi la base d'un procédé de diagnostic ou, n'être qu'une étape supplémentaire dans une des techniques mentionnées ci-dessus (afin notamment d'augmenter la concentration de la séquence cible et donc la sensibilité du diagnostic), consiste à amplifier la séquence d'acide nucléique ciblée. Plusieurs techniques permettant l'amplification spécifique d'une séquence d'acide nucléique ont été décrites, dont la plus utilisée est l'Amplification en Chaîne par Polymérase (ACP), ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Dans le cadre de cette dernière technique, des séquences nucléiques complémentaires des séquences cibles, appelées amorces, sont utilisées pour amplifier lesdites séquences cibles.

[0006] Les réactions de PCR impliquent une répétition de cycles, dont le nombre varie généralement de 20 à 50, et qui sont composés chacun de trois phases successives, à savoir : dénaturation, hybridation, élongation. Respectivement, la première phase correspond à la transformation des acides nucléiques bicaténares en acides nucléiques monocaténares, la seconde phase à l'hybridation moléculaire entre la séquence cible et les amorces complémentaires de ladite séquence, et la troisième phase à l'élongation des amorces complémentaires hybridées à la séquence cible, par une ADN polymérase. Ces phases sont menées à des températures spécifiques : généralement 95°C pour la dénaturation, 72°C pour l'élongation, et entre 30°C et 65°C pour l'hybridation, selon la température d'hybridation (T_m) des amorces utilisées. Il est aussi possible d'effectuer les étapes d'hybridation et d'élongation à la même température (généralement 60 °C).

[0007] Une réaction de PCR consiste donc en un enchaînement de cycles thermiques répétitifs au cours duquel le nombre de molécules d'ADN cible servant de matrice est théoriquement doublé à chaque cycle. En réalité, le rendement de la PCR est inférieur à 100%, si bien que la quantité de produit X_n obtenu après n cycles est :

$$X_n = X_{n-1} (1 + r_n),$$

où

[0008] X_{n-1} est la quantité de produit obtenu au cycle précédent, et r_n le rendement de la PCR au cycle n ($0 < r_n \leq 1$).

[0009] En considérant le rendement constant, c'est-à-dire identique pour chaque cycle, la quantité de produit X_n obtenu après n cycles à partir d'une quantité initiale X_0 est alors :

$$X_n = X_0 (1 + r)^n \quad (A)$$

[0010] En réalité, le rendement r diminue au cours de la réaction de PCR, du fait de plusieurs facteurs, tel qu'une quantité limitante d'au moins un des réactifs nécessaires à l'amplification, l'inactivation de la polymérase par ses passages répétés à 95°C, ou son inhibition par les pyrophosphates produits par la réaction.

[0011] Du fait de cette diminution du rendement, la cinétique d'une réaction de PCR présente d'abord une phase

exponentielle (tant que r est constant), qui évolue ensuite vers une phase de plateau lorsque r diminue

[0012] Au cours de la phase exponentielle, l'équation (A) ci-dessus est valable, et peut aussi s'écrire :

5

$$\log (X_n) = \log (X_0) + n \log (1 + r)$$

10

[0013] Ainsi, dans la phase exponentielle de la PCR, la courbe présentant la quantité de produit, en échelle logarithmique, en fonction du nombre de cycles, est une droite de pente $(1 + r)$ et qui coupe l'axe des ordonnées à une valeur égale au logarithme de la concentration initiale.

[0014] La mesure en temps réel, de la quantité de produit obtenu, peut donc permettre de connaître la concentration initiale de matrice, ce qui est particulièrement utile dans un grand nombre d'applications, par exemple pour mesurer la charge virale d'un malade, ou encore pour connaître la variabilité d'un transcriptome.

15

[0015] Généralement, les PCR impliquent des volumes réactionnels allant de 2 à 50 μl et sont effectuées dans des tubes, des microtubes, des capillaires ou des systèmes connus de l'homme de l'art sous le terme "microplaques" (en fait des ensembles de micro tubes solidarisés). Chaque lot de tubes ou de contenants équivalents doit donc être successivement porté aux trois températures correspondant aux différentes phases de la PCR, et ce autant de fois que de cycles désirés.

20

[0016] L'utilisation de tubes ou de systèmes s'y approchant oblige l'utilisateur à effectuer de multiples manipulations pour préparer autant de tubes et de solutions (connues de l'homme de l'art sous l'expression "mix PCR") que de séquences cibles qu'il souhaite amplifier même à partir d'un échantillon unique d'acides nucléiques, à l'exception des procédés d'amplification "multiple", qui permettent l'amplification de plusieurs séquences cibles simultanément dans le même contenant, soit par l'utilisation d'amorces dites peu spécifiques qui peuvent s'hybrider avec plusieurs séquences cibles comme par exemple la technique RAPD - *Random Amplified Polymorphism DNA*, soit par l'utilisation d'amorces spécifiques mais en nombre plus important, chaque couple d'amorces utilisé permettant l'amplification d'une séquence cible. Ces amplifications multiplex correspondent à des cas particuliers et ne sont pas la norme. De surcroît, elles ne garantissent pas l'absence d'interactions d'une réaction d'amplification sur une autre, et pour des raisons notamment de possibles hybridations entre les amorces, ne peuvent qu'être très limitées dans le nombre de séquences cibles amplifiées par contenant.

25

30

[0017] Ces différentes manipulations impliquent de nombreux inconvénients.

[0018] En premier lieu, elles sont consommatrices de temps. En second lieu, elles ne sont pas sans risques du point de vue des éventuelles contaminations d'un tube à l'autre ou depuis l'environnement extérieur (poussière, bactérie, aérosol ou tout autre contaminant susceptible de contenir des molécules d'acides nucléiques ou des molécules susceptibles d'influer sur l'efficacité de la réaction d'amplification). De plus, elles n'assurent pas une homogénéité de volume et de concentration en réactifs d'un tube à l'autre. Enfin elles imposent l'utilisation de volumes manipulables manuellement, généralement supérieurs à 1 μl , ce qui a une incidence sur les coûts liés à la réalisation des PCR, les réactifs utilisés étant chers.

35

[0019] L'utilisation de dispositifs conçus pour automatiser au moins partiellement de telles manipulations permet de pallier certains de ces inconvénients. Toutefois, de tels automates sont relativement chers et leur utilisation ne se trouve donc généralement économiquement justifiée que dans le cas des PCR en grandes séries, par exemple pour le séquençage des génomes.

40

[0020] Il existe aussi certains automates permettant de réaliser des réactions de PCR cinétiques. Comme il a été vu plus haut, la réalisation d'une PCR cinétique nécessite de quantifier en temps réel, et de façon spécifique, la séquence cible amplifiée. L'utilisation d'un intercalant fluorescent dans le mélange réactionnel permet de mesurer l'augmentation de la quantité totale d'ADN double brin dans ledit mélange. Toutefois, cette méthode ne permet pas de discriminer l'amplification de la séquence cible par rapport au bruit de fond ou à une éventuelle amplification non spécifique. Plusieurs systèmes de sondes ont été décrits récemment pour permettre de mesurer spécifiquement l'amplification d'une séquence cible déterminée. Ils sont basés sur des oligonucléotides complémentaires de ladite séquence, et liés à des couples de groupements de fluorophores ou fluorophores/*quencher*s, de telle sorte que l'hybridation de la sonde à sa cible et les cycles d'amplification successifs entraînent, suivant les cas, une augmentation ou une diminution de la fluorescence totale du mélange, proportionnellement à l'amplification de la séquence cible.

45

50

[0021] A titre d'exemples de sondes utilisables pour réaliser des PCR cinétiques, on peut citer le système TaqMan[™] (ABI[®], le système AmpliSensor[™] (InGen), et le système Sunrise[™] (Oncor[®], Appligène[®]).

55

[0022] Le système le plus utilisé actuellement est le système Taq Man[™]

[0023] Ce procédé associe les activités ADN polymérase et 5 \rightarrow 3' nucléase de la Taq polymérase au cours de la PCR. Son principe en est le suivant : en sus des deux amorces de séquence complémentaire de celle de la cible à quantifier, une sonde, appelée sonde *reporter*, est ajoutée dans le milieu réactionnel. Elle a la capacité de s'hybrider à la cible

dans le corps de la séquence amplifiée, mais ne peut être amplifiée elle-même. En effet, un groupe phosphoryle ajouté à l'extrémité 3' de la sonde empêche son extension par la Taq polymérase. Un dérivé de la fluoescéine et un dérivé de la rhodamine sont incorporés dans la sonde, respectivement aux extrémités 5' et 3'. La sonde est de petite taille, aussi le dérivé de la rhodamine, situé à proximité de la fluoescéine, absorbe-t-il l'énergie émise par la fluoescéine soumise à une source d'excitation (phénomène de *quenching*).

[0024] Une fois les amorces hybridées à la cible, au cours de la réaction d'extension, la Taq ADN polymérase attaque la sonde par son activité 5' nucléase, libérant le groupement *quencher* et rétablissant ainsi l'émission de fluorescence. L'intensité de la fluorescence émise est alors proportionnelle à la quantité de produits de PCR formés, ce qui permet d'obtenir un résultat quantitatif. La fluorescence émise est proportionnelle au nombre de molécules cibles de départ. La cinétique de développement de la fluorescence peut être suivie en temps réel au cours de la réaction d'amplification.

[0025] Cette technique présente l'avantage d'être facilement automatisable. Un appareil permettant de réaliser cette technique, l'ABI Prism 7700™, est commercialisé par la société Perkin-Elmer. Cet appareil combine un thermocycleur et un fluorimètre. Il est capable de détecter l'augmentation de fluorescence générée au cours d'un test de quantification selon le procédé TaqMan™, ceci grâce à des fibres optiques situées au-dessous de chaque tube et reliées à une caméra CCD qui détecte, en temps réel, le signal émis par les groupes fluorescents libérés au cours de la PCR. Les données quantitatives sont déduites à partir de la détermination du cycle auquel le signal du produit d'amplification atteint un certain seuil déterminé par l'utilisateur. Plusieurs études ont en effet montré que ce nombre de cycles était proportionnel à la quantité de matériel initial (Gibson, Heid et al. 1996; Heid, Stevens et al. 1996; Williams, Giles et al. 1998).

[0026] Le nombre d'applications potentielles d'un tel appareil est considérable, tant en santé humaine qu'en agroalimentaire et en contrôle qualité. Malheureusement, l'ABI Prism 7700™ et les quelques autres appareils concurrents commercialisés actuellement sont extrêmement chers. De plus, ils ne peuvent être utilisés que par un manipulateur qualifié. En pratique, de tels appareils ne sont donc utilisés que dans certaines structures très spécialisées.

[0027] Il existe donc aujourd'hui un réel besoin pour un système d'amplification d'acides nucléiques, le cas échéant mesurée en temps réel, et qui ne présente pas les inconvénients cités ci-dessus de l'état de la technique.

[0028] L'objectif de la présente invention est de proposer un tel système qui permette de diminuer considérablement le nombre de manipulations nécessaires à la mise en oeuvre d'une méthode d'amplification sur une pluralité de séquences cibles et, en conséquence, de diminuer le temps nécessaire à cette opération.

[0029] Un autre objectif de la présente invention est de proposer un tel système qui minimise les risques de contamination d'un contenant à l'autre.

[0030] Un autre objectif de la présente invention est de proposer un tel système qui réduise les volumes de réactifs mis en jeu et donc les coûts.

[0031] Un autre objectif de la présente invention est de proposer un tel système qui optimise une répartition homogène en volume et en concentration des réactifs nécessaires à la PCR dans les contenants.

[0032] Un autre objectif est de fournir à tous les utilisateurs potentiels, notamment aux centres hospitaliers, aux laboratoires d'analyses médicales, aux industriels de l'agroalimentaire et aux laboratoires de contrôle sanitaire, un appareil d'utilisation et de maintenance aisées, pour effectuer en routine des amplifications d'acides nucléiques quantifiées en temps réel.

[0033] Dans cette demande, plusieurs termes sont employés, dont la lignification est la suivante :

- Une "réaction d'amplification d'acides nucléiques" fait référence à n'importe quelle méthode d'amplification d'acides nucléiques connue de l'homme du métier. On peut citer, à titre d'exemples et de façon non restrictive, l'Amplification en Chaîne par Polymérase (ACP), plus souvent désignée par l'homme du métier sous son acronyme anglophone, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la TMA (*transcription mediated amplification*), la NASBA (*nucleic acid sequence based amplification*), la 3SR (*self sustained sequence réplication*), l'amplification par déplacement de brin, ou SDA (*strand displacement amplification*) et la LCR (*ligase chain reaction*).

[0034] La matrice initiale de l'amplification peut être n'importe quel type d'acide nucléique, ADN ou ARN, génomique, plasmidique, recombinant, ADNc, ARNm, ARN ribosomal, ARN viral ou autre. Lorsque la matrice initiale est un ARN, une première étape de transcription reverse est en général réalisée pour obtenir une matrice ADN. Cette étape ne sera en général pas mentionnée dans ce texte, car l'homme du métier sait exactement quand et comment la réaliser. Il est bien entendu que les dispositifs de l'invention sont utilisables pour amplifier et éventuellement quantifier spécifiquement des séquences d'ARN aussi bien que d'ADN. Dans la suite du texte, le terme "PCR" sera donc le terme générique utilisé pour désigner aussi bien la PCR proprement dite que la RT-PCR (*Reverse Ttranscription - Polymerase Chain Reaction*).

- Parmi les réactions d'amplification citées ci-dessus, certaines sont isothermes. D'autres, notamment la PCR et la LCR, impliquent de porter le mélange réactionnel à différentes températures au cours du temps, de façon cyclique. De telles réactions sont appelées ici "réactions d'amplification d'acides nucléiques thermo-dépendantes". Dans la suite de ce texte, le dispositif de l'invention sera principalement décrit dans son application à la PCR. Toutefois, il

est bien évident que ce dispositif n'est pas limité à cette technique, et qu'il peut être utilisé aussi pour n'importe quelle réaction d'amplification d'acides nucléiques, voire pour d'autres réactions enzymatiques et/ou de biologie moléculaire. Ce dispositif est particulièrement adapté aux réactions qui nécessitent des volumes faibles et le passage cyclique du mélange réactionnel à plusieurs températures, comme cela apparaîtra clairement dans la suite.

- Un des objectifs de la présente invention est de fournir un nouveau dispositif pour effectuer des réactions d'amplification dites "quantitatives", c'est-à-dire permettant de déterminer la concentration de séquence cible initialement présente dans le mélange réactionnel. Plusieurs types de réactions d'amplification quantitatives ont été décrits. On peut distinguer les amplifications quantitatives basées sur l'emploi d'un standard externe, les amplifications compétitives, utilisant un standard interne, et enfin les amplifications cinétiques, dont le principe a été évoqué plus haut, et qui consistent à mesurer en temps réel, l'augmentation de la quantité de la séquence cible. Ce type d'amplification sera désigné ici indifféremment sous les termes "amplification cinétique (d'acides nucléiques)" "PCR cinétique", "amplification (d'acides nucléiques) quantifiée en temps réel", ou encore "PCR en temps réel". Les termes entre parenthèses sont parfois omis.
- Dans cette demande, le terme "réactif" doit être compris au sens large, comme désignant n'importe quel élément nécessaire soit à la réaction d'amplification proprement dite, soit à sa détection. Suivant cette définition, les sels, les dNTP, les amorces ou encore la polymérase, sont des réactifs nécessaires à la PCR. De même, un intercalant fluorescent, ou une sonde, sont ici considérés comme des réactifs participant à la détection des produits amplifiés, bien qu'ils ne réagissent pas au sens littéral.

[0035] D'autres termes désignant certains éléments du dispositif de l'invention seront définis plus loin dans la description détaillée de l'invention.

[0036] Certains éléments du dispositif sont numérotés en référence aux dessins, qui illustrent quelques modes et variantes non limitatifs de réalisation l'invention, et dans lesquels :

- la figure 1 représente une vue latérale d'une réalisation simplifiée du dispositif selon la présente invention ;
- la figure 2 représente une vue supérieure de la platine chauffante, dans le cas où les blocs (21 à 23) sont des secteurs de disque (figure 2A), et dans le cas où ils sont constitués de secteurs de couronne (figure 2B) ;
- la figure 3 représente une vue en perspective d'un premier exemple de réalisation de la cartouche (1), pourvue des chambres réactionnelles et d'une partie des moyens de déplacement ;
- la figure 4 représente une vue en coupe de cette cartouche en accord partiel avec l'invention selon la ligne AA ;
- la figure 5 représente une vue supérieure de la partie inférieure (socle) d'un deuxième mode de réalisation particulier de la cartouche selon l'invention. Les cotes sont données à titre purement indicatif, et ne sont en aucun cas limitatives ;
- la figure 6 représente une vue en coupe de cette cartouche inférieure, selon la ligne AA de la figure 5 ;
- la figure 7 représente une vue supérieure de la partie supérieure (couvercle) de la cartouche représentée aux figures 5 et 6 ;
- la figure 8 représente une vue en coupe de cette cartouche supérieure, suivant la ligne BB de la figure 7 ;
- la figure 9 représente une cartouche complète, constituée du socle représenté aux figures 5 et 6 (traits pleins), et du couvercle représenté aux figures 7 et 8 (traits discontinus) ;
- la figure 10 montre trois modélisations de la cartouche de la figure 9, au-dessus de laquelle se trouvent les moyens d'excitation/mesure de la fluorescence (5) ;
- la figure 11 montre une coupe schématique d'un canal (12) possédant un dispositif de "perte de charge".

[0037] L'invention concerne en premier lieu tout dispositif pour effectuer des réactions enzymatiques et/ou de biologie moléculaire nécessitant au moins deux températures d'incubation différentes, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins une plaque ou cartouche (1), selon l'une quelconque des revendications 1 à 22, présentant une pluralité

de chambres réactionnelles (13) et un réservoir (11), lesdites chambres réactionnelles étant reliées au réservoir par des canaux (12) ;

- au moins une platine de chauffage (2) présentant au moins deux zones distinctes pouvant être portées à au moins deux températures différentes;
- des moyens (3) de déplacement relatif entre ladite cartouche et ladite platine, permettant une variation cyclique de la température des chambres réactionnelles.

[0038] La température de chaque zone de la platine peut être homogène ou, le cas échéant, cette température peut varier suivant un gradient

[0039] Plusieurs types de réactions de biologie moléculaire nécessitent de placer le mélange réactionnel à différentes températures en fonction du temps. Ceci est le cas par exemple lorsqu'on souhaite inactiver une enzyme après l'avoir utilisée (par exemple, une nucléase de restriction), ou pour tester la stabilité d'un complexe. Dans ce dernier cas, on peut envisager de placer un complexe (par exemple, un complexe antigène/anticorps, ou récepteur/ligand), dont l'un des éléments est couplé à un fluorophore et l'autre à un *quencher* de fluorescence, dans une des chambres réactionnelles du dispositif. La platine est alors programmée pour présenter plusieurs températures dans un ordre croissant, le cas échéant sous forme d'un gradient. La stabilité du complexe est alors testée en déplaçant la cartouche sur la platine, de façon à ce que la température de la chambre réactionnelle s'élève progressivement, et en observant l'augmentation de la fluorescence, à l'aide de moyens d'excitation / mesure de la fluorescence placés en regard de la chambre réactionnelle. L'augmentation de la fluorescence traduit alors la dissociation du complexe.

[0040] Le dispositif de l'invention est particulièrement adapté à des réactions nécessitant une variation cyclique de la température des chambres réactionnelles, ce qui est le cas pour certaines réactions d'amplifications d'acides nucléiques, par exemple pour l'amplification en chaîne par polymérase (PCR), ou pour la réaction en chaîne par ligase (LCR).

[0041] L'invention porte donc en particulier sur un dispositif pour l'amplification en chaîne thermo-dépendante de séquences d'acides nucléiques cibles, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins une cartouche selon l'une des revendications 1 à 22
- au moins une platine de chauffage (2) présentant au moins deux zones distinctes pouvant être portées à au moins deux températures différentes, correspondant aux phases des cycles d'amplification desdits acides nucléiques cibles ;
- des moyens (3) de déplacement relatif entre ladite cartouche et ladite platine, permettant une variation cyclique de la température des chambres réactionnelles.

[0042] Un tel système selon l'invention est moins complexe que les systèmes de l'art antérieur, dans la mesure où les températures nécessaires aux cycles de l'amplification en chaîne sont assurées par des zones distinctes de températures constantes et non par une platine dont on doit faire varier la température.

[0043] Il est important de noter que les réactions d'amplification en chaîne thermo-dépendantes nécessitent le passage des échantillons à au moins deux températures. Par exemple, la LCR nécessite à chaque cycle une phase à environ 95°C pour dénaturer l'ADN cible, puis une phase entre 55 et 65°C (en fonction du T_m des sondes), pour donner lieu à l'hybridation / ligation. En ce qui concerne la PCR, chaque cycle se décompose en général en trois phases, à savoir la dénaturation à environ 95°C, l'hybridation dont la température dépend du T_m des sondes, et l'élongation, habituellement réalisée à 72°C. Il est cependant possible de réaliser des PCR ayant des cycles simplifiés, dans lesquels l'hybridation et l'élongation se font à la même température, si bien que chaque cycle nécessite seulement deux températures différentes.

[0044] Il pourra être envisagé différentes variantes du dispositif décrit ci-dessus. Selon une variante préférentielle de l'invention, le système comprend les caractéristiques suivantes :

- des amorces spécifiques de séquences cibles à amplifier sont pré-réparties dans les chambres réactionnelles (13),
- le réservoir (11) est destiné à recevoir un fluide composé notamment d'un échantillon d'acides nucléiques à analyser et des réactifs nécessaires à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase, à l'exception des amorces,
- la platine de chauffage (2) présente trois zones distinctes pouvant être portées à trois températures différentes, correspondant aux trois phases des cycles d'amplification en chaîne par polymérase.

[0045] Selon cette variante préférentielle, il est possible de distribuer, à partir d'un réservoir, un fluide contenant un échantillon d'acides nucléiques à analyser et les réactifs nécessaires à la PCR dans une pluralité de chambres réactionnelles contenant des amorces spécifiques de séquences cibles d'acides nucléiques à amplifier, et d'autoriser le processus d'amplification en soumettant le contenu des chambres successivement à différentes températures (à savoir celles nécessaires à la dénaturation, l'hybridation et l'élongation) une multitude de fois grâce à un mouvement relatif entre la cartouche incluant lesdites chambres réactionnelles et ladite platine de chauffage présentant deux ou trois zones distinctes pouvant être portées à des températures différentes.

[0046] Le cas échéant, les chambres réactionnelles (13) peuvent contenir des réactifs nécessaires à une réaction de PCR en temps réel autres que les amorces mentionnées ci-dessus. Dans une réalisation préférée du dispositif de l'invention, les chambres réactionnelles comportent également, en plus des amorces, une ou plusieurs sonde(s) spécifique(s) de la séquence à amplifier. La distribution des sondes dans les chambres réactionnelles peut aussi être telle que certaines chambres comportent des sondes spécifiques des séquences à amplifier et d'autres chambres comportent des sondes contrôle, ne reconnaissant pas *a priori* la séquence à amplifier. Ces sondes peuvent être marquées et, si plusieurs sondes sont présentes dans une même chambre réactionnelle (par exemple une sonde spécifique de la séquence à amplifier et une sonde contrôle), ces sondes seront de préférence marquées par des fluorophores différents.

[0047] Dans une autre variante du dispositif, des réactifs supplémentaires, tels que les dNTP ou des sels, sont initialement déposés dans les chambres réactionnelles. Ces réactifs seront alors absents, ou présents en moindre quantité, dans le fluide déposé dans le réservoir (11). Dans le cas extrême, tous les réactifs nécessaires à la réaction de PCR, à l'exception de la matrice, sont déposés dans les chambres réactionnelles (13), et le fluide déposé dans le réservoir (11) comprendra alors uniquement l'échantillon d'ADN (ou d'ARN) à amplifier.

[0048] Les variantes décrites ci-dessus supposent que plusieurs réactions soient réalisées en parallèle, avec des amorces et/ou des sondes différentes, sur un même échantillon. Il s'agit donc de la caractérisation d'un échantillon unique (ou de quelques échantillons si le réservoir est divisé en quelques sous-réservoirs) suivant plusieurs critères. Dans certaines applications, on souhaite au contraire caractériser une multitude d'échantillons suivant un critère unique ou un faible nombre de critères. Ceci est le cas par exemple en recherche, lorsqu'on souhaite cribler une banque de phages ou de bactéries pour la présence d'un gène donné. Il est dans ce cas nécessaire d'effectuer une PCR sur un grand nombre d'échantillons, à partir d'un couple d'amorces donné. Le dispositif de l'invention est adapté aussi à ce type de manipulations. Pour cela, les échantillons sont déposés dans les chambres réactionnelles (13). Les amorces peuvent être introduites dans le fluide déposé dans le réservoir (11), avec les autres réactifs nécessaires à la PCR. Bien entendu, cette configuration n'exclut pas non plus que certains réactifs autres que l'échantillon à analyser soient pré-déposés dans les chambres réactionnelles (13).

[0049] Quelle que soit la variante du dispositif choisie, et quels que soient les réactifs déposés dans les chambres réactionnelles (13), ils peuvent y être déposés avantageusement par un simple dépôt liquide, suivi d'un séchage. L'arrivée du fluide en provenance du réservoir (11) permet ensuite la remise en solution de ces réactifs. La quantité de chaque réactif déposée est calculée en fonction du volume de fluide qui pénétrera dans chaque chambre réactionnelle (13), de telle sorte que la remise en solution des réactifs aboutisse à la concentration finale souhaitée pour chacun d'entre eux. Des cartouches telles que décrites ci-dessus, dans lesquelles au moins une partie des chambres réactionnelles (13) comportent des réactifs qui y ont été chargés par un dépôt liquide, suivi d'un séchage, de telle sorte que ces réactifs soient remis en solution par l'arrivée d'un fluide dans ces chambres réactionnelles, sont également partie intégrante de l'invention.

[0050] Le dispositif décrit ci-dessus présente l'avantage d'autoriser un remplissage concomitant de toutes les chambres réactionnelles, ce qui diminue le temps de préparation et les risques de contamination d'une chambre à l'autre. Ce dispositif présente également l'avantage de pouvoir être miniaturisé et d'impliquer l'utilisation de volumes de réactifs plus faibles que dans l'état de la technique.

[0051] Enfin on notera aussi que, grâce à la platine de chauffage spécifique qu'elle préconise, l'invention permet d'accélérer les cycles de PCR, puisqu'il n'est pas nécessaire pour effectuer les différentes phases (dénaturation, hybridation, élongation) de faire varier la température de la platine chauffante ou de l'atmosphère comme dans l'état de la technique, le mouvement relatif entre la cartouche et la platine permettant de soumettre rapidement et successivement le contenu de chacune des chambres réactionnelles à trois températures distinctes dédiées à chacune de ces phases. L'utilisation de faibles volumes réactionnels, et d'un plancher de faible épaisseur pour la cartouche (1), permettent aussi de limiter l'inertie thermique au niveau des chambres réactionnelles, et contribuent donc à la rapidité de la réaction.

[0052] L'invention porte également sur un dispositif pour l'amplification en chaîne thermo-dépendante de séquences d'acides nucléiques cibles, mesurée en temps réel, caractérisé en ce qu'il comprend les mêmes éléments que l'un quelconque des dispositifs décrits ci-dessus, et comportant en outre des moyens optiques (5) d'excitation / mesure de la fluorescence, disposés de manière à exciter et mesurer à chaque cycle la fluorescence du contenu des chambres réactionnelles.

[0053] Un des éléments particulièrement originaux des dispositifs décrits ci-dessus est l'élément appelé indifféremment plaque ou cartouche réactionnelle (1). Cet élément peut être recyclable ou, de façon préférée, consommable, et constitue

en soi un aspect de la présente invention. Ainsi, l'invention porte également sur une cartouche réactionnelle selon la revendication 1.

[0054] La disposition des chambres réactionnelles et des canaux par rapport au réservoir permet de répartir un fluide de façon homogène dans les chambres réactionnelles, à partir du réservoir. DE-A-198 52835 divulgue une cartouche réactionnelle du même type.

[0055] Le diamètre des canaux sera préférentiellement choisi suffisamment faible pour ne pas autoriser une distribution par gravité du fluide présent dans le réservoir dans les chambres réactionnelles, ceci de façon à éviter un remplissage non reproductible de ces chambres. Ce diamètre sera ainsi préférentiellement inférieur ou égal à environ 0,2 mm. Au sujet de ce diamètre, on notera que la section des canaux sera préférentiellement circulaire mais qu'elle pourra être également de toute autre forme et notamment polygonale, le "diamètre" des canaux visant alors leur plus grande largeur en section.

[0056] Le réservoir destiné à recevoir l'échantillon d'acides nucléiques et les réactifs nécessaires à la PCR pourra présenter une capacité variable, comprise par exemple entre environ 0,1 ml et environ 1 ml.

[0057] La cartouche comprend de préférence entre environ 20 et environ 500 chambres réactionnelles et, de manière encore préférée, entre 60 et 100 chambres réactionnelles.

[0058] Le volume de ces chambres pourra également varier selon les modes de réalisation. Avantageusement, ces chambres présentent un volume compris entre environ 0,2 et 50 μ l, de préférence entre 1 μ l et 10 μ l.

[0059] Dans les cartouches de l'invention, la jonction entre les canaux (12) et le réservoir (11) se fait à la périphérie du réservoir, et le fond dudit réservoir est convexe, de façon à assurer la répartition d'un fluide contenu dans le réservoir au niveau de l'entrée des canaux.

[0060] On notera qu'une cartouche selon l'invention peut présenter de multiples formes. Toutefois, selon une variante préférentielle de l'invention, cette cartouche présente une forme circulaire. Le réservoir est prévu sensiblement au centre de la cartouche, les chambres réactionnelles étant réparties en cercle autour du réservoir, et les canaux reliant le réservoir aux chambres étant prévus essentiellement radialement. Une telle architecture permet d'optimiser le remplissage des chambres réactionnelles à partir du réservoir central.

[0061] Dans une réalisation particulière des cartouches circulaires de l'invention, le fond du réservoir (11) est conique.

[0062] Egalement préférentiellement, lesdites chambres réactionnelles sont prévues relativement à la périphérie de ladite cartouche. Ainsi, il est passible d'optimiser le nombre de chambres réactionnelles pouvant être prévues sur la cartouche et remplies à partir du réservoir central.

[0063] Selon une variante de invention, une telle cartouche comprend autant de canaux que de chambres réactionnelles. Toutefois, dans certains modes de réalisation, on pourra prévoir des tronçons de canaux communs à plusieurs chambres réactionnelles.

[0064] L'un des avantages de la présente invention est d'autoriser une miniaturisation du dispositif qu'elle propose. Ainsi, avantageusement, la cartouche présente de préférence un diamètre compris entre environ 1 et 10 cm.

[0065] Une variante des cartouches de l'invention décrites ci-dessus, qu'elle que soit leur géométrie, consiste à diviser le réservoir (11) en 2 à 20, de préférence 2 à 8 sous-réservoirs, permettant d'analyser simultanément plusieurs échantillons sur une même cartouche. Dans ce cas, chacune des chambres réactionnelles (13) est reliée à un seul de ces sous-réservoirs par un canal (12).

[0066] La profondeur des chambres réactionnelles (par rapport aux canaux) peut aussi varier en fonction des modes de réalisation de l'invention. Selon une variante préférentielle, ces chambres présentent une profondeur comprise entre environ 0,5 mm et 1,5 mm.

[0067] On notera par ailleurs que l'épaisseur de la cartouche dépend de plusieurs facteurs et notamment du matériau la constituant. En pratique, cette cartouche est préférentiellement constituée en matière plastique, de préférence en polycarbonate, dont les propriétés physiques, optiques et thermiques, sont appropriées pour la réalisation de la présente invention. L'épaisseur des cartouches de l'invention est de préférence comprise entre 0,5 et 5 mm.

[0068] Afin de faciliter les échanges thermiques entre le contenu des chambres réactionnelles et la platine, l'épaisseur du "plancher" de celles-ci devra être préférentiellement aussi faible que possible. Cette épaisseur dépend du matériau utilisé pour réaliser la cartouche. Préférentiellement, elle est comprise entre 0,05 et 0,5 mm, par exemple environ 0,25 mm.

[0069] Les chambres réactionnelles des cartouches de l'invention sont de préférence fermées par une paroi supérieure transparente (17), par exemple en plastique transparent, afin de permettre l'excitation et la mesure de la fluorescence du fluide réactionnel, dans des bonnes conditions.

[0070] Dans une réalisation particulière de l'invention, les chambres sont pourvues d'évents (système ouvert), permettant à l'air qu'elles contiennent de s'échapper lors de leur remplissage par le fluide provenant du réservoir.

[0071] Dans le cas ci-dessus, où les chambres (13) sont pourvues d'évents (14), les canaux (12) sont préférentiellement constitués d'au moins deux parties de diamètres différents (121 et 122), le diamètre de la deuxième partie (122) étant inférieur à celui de la première partie (121), de façon à créer une perte de charge dans le canal (12). Ainsi, si un canal se remplit plus vite qu'un autre sous l'effet de la pression, le phénomène de perte de charge permet d'arrêter la progression du fluide dans le ou les canaux dont la première partie (121) est remplie, jusqu'à ce que tous les canaux soient remplis

de la même façon. Ceci permet de « pré-calibrer » les volumes pour chaque canal, afin d'assurer un remplissage homogène des différentes chambres réactionnelles. La deuxième partie du canal (122) peut être constituée par exemple d'un capillaire de verre, de diamètre beaucoup plus faible que la première partie (121), ledit capillaire étant inclus dans une cartouche en plastique.

[0072] Il est aussi possible de prévoir des enceintes (15) dans lesquelles débouchent les événements (14) des chambres réactionnelles. Ces enceintes possèdent une ouverture (16) vers l'extérieur de la cartouche (système ouvert), et présentent l'intérêt, d'une part, de récupérer sans pollution les éventuels surplus de fluide qui sortiraient des chambres réactionnelles par les événements (14) et, d'autre part, de pouvoir se fermer après le remplissage des chambres réactionnelles. Cette fermeture peut se faire par exemple en utilisant une bande adhésive, et permet de passer en système clos pour effectuer l'amplification proprement dite. Ceci permet d'éviter ou au moins limiter l'évaporation du fluide contenu dans la cartouche (1). Cette réalisation de l'invention est illustrée à la figure 11.

[0073] Alternativement, il est possible de travailler en système clos dès le remplissage des chambres réactionnelles, en provoquant dans la cartouche une dépression suivie d'un rétablissement de la pression, comme cela sera détaillé plus loin. Des cartouches dans lesquelles les chambres réactionnelles ne possèdent pas d'autre ouverture que l'arrivée du canal (12) (chambres réactionnelles dites "closes") font donc également partie de l'invention.

[0074] Les cartouches décrites ci-dessus, prévues soit pour un usage en système ouvert, soit pour un usage en système fermé, comportent de préférence une ouverture adaptable à des moyens (4) de modulation de la pression dans le réservoir (11), permettant de déplacer le fluide présente dans le réservoir vers les chambres réactionnelles.

[0075] L'invention porte également sur un procédé de remplissage en système clos des chambres réactionnelles (13) d'une cartouche (1) telle que décrite au paragraphe précédent, dans la variante où les chambres réactionnelles sont dorsales, lequel procédé comporte les étapes suivante

- remplir au moins partiellement le réservoir (11) avec un fluide,
- connecter la cartouche (1) aux moyens (4) de modulation de la pression,
- appliquer une dépression à l'intérieur de la cartouche, puis rétablir la pression.

[0076] Dans une variante des cartouches de l'invention, chaque canal (12) est équipé d'une cavité anti-reflux (123) au niveau de sa jonction avec le réservoir (11), ladite cavité anti-reflux étant constituée d'une portion de canal sensiblement verticale, d'un diamètre supérieur ou égal à celui du canal (12). Cette variante présente deux principaux avantages. D'une part, ces cavités anti-reflux permettent de prévenir les contaminations croisées en cas de retour intempestif de fluide vers le réservoir (11), ou au cas où tout le fluide ne se serait pas engagé dans les canaux. D'autre part, ces cavités permettent de prévoir, dans les dispositifs de l'invention, un bouchon dont les dentelures viennent épouser ces entrées verticales, afin de boucher les canaux après l'adressage du fluide réactionnel mais avant la réaction d'amplification. Ceci permet de travailler en système parfaitement clos, et donc d'éviter tout risque de contamination et d'évaporation. Toutefois, il est important de noter que les cavités anti-reflux, et l'utilisation d'un bouchon au niveau du réservoir pour boucher l'entrée des canaux du côté du réservoir, peuvent être employées aussi dans le cas de systèmes ouverts tels que décrits ci-dessus, où les chambres réactionnelles sont pourvues d'événements.

[0077] Dans une réalisation préférée des cartouches de l'invention, une partie au moins des chambres réactionnelles (13) comporte des oligonucléotides. De façon encore préférée, chacune des chambres réactionnelles (13) comporte deux amorces spécifiques d'une séquence d'acide nucléique à amplifier et, facultativement, une ou plusieurs sonde(s) marquée(s) spécifique(s) de ladite séquence. Une telle sonde peut être marquée de façon à ce que son signal augmente lorsqu'elle s'hybride à sa séquence cible (système Sunrise™), ou de façon à ce que l'élongation à partir d'un brin sur laquelle elle est hybridée entraîne une diminution ou une augmentation du signal (système AmptiSensor™ ou système TaqMan™, respectivement). La présence de telles sondes dans les chambres réactionnelles permet de réaliser des amplifications quantifiées en temps réel, avec un dispositif de l'invention disposant de moyens (5) d'excitation / mesure de la fluorescence, tel que décrit plus haut. Des sondes contrôles, non spécifiques de la séquence à amplifier, et marquées d'une façon différente des sondes spécifiques, peuvent aussi être utilisées, pour détecter d'éventuelles contaminations.

[0078] Dans la réalisation de l'invention décrite ci-dessus, où les chambres réactionnelles comportent des amorces et, facultativement une ou plusieurs sonde(s), ces différentes sondes et amorces seront choisies de préférence de telle sorte que leurs températures de fusion (Tm) respectives soient proches. En particulier, le Tm des différentes amorces sera de préférence compris dans un même intervalle d'environ 5°C. De même, les différentes sondes auront de préférence un Tm compris dans un même intervalle de 5°C, qui peut être différent de l'intervalle des Tm des amorces. Dans ce cas, les sondes seront choisies de telle sorte que leur Tm soit supérieur à celui des amorces, la différence entre le Tm des différentes catégories d'oligonucléotides étant alors de préférence de l'ordre de 5°C. La température d'hybridation retenue pour effectuer l'amplification correspond alors à la plus basse des températures de fusion des amorces.

[0079] Les chambres réactionnelles (13) des cartouches de l'invention peuvent aussi comporter, outre les amorces et les sondes éventuelles, un ou plusieurs autres réactifs nécessaires à la réaction de PCR ou à la mesure de l'ampli-

fication. Il peut s'agir, par exemple, de sels, de dNTP, ou d'un intercalant fluorescent de l'ADN double brin, de type SybrGreen (marque déposée). Comme mentionné plus haut, tous ces réactifs sont avantageusement déposés au niveau des chambres réactionnelles (13) par le dépôt d'une solution liquide, suivi d'un séchage.

[0080] Selon un mode de réalisation alternatif des cartouches de l'invention, les cartouches sont prévues pour le criblage d'un grand nombre d'échantillons suivant un faible nombre de critères. Ceci implique que l'utilisateur de ces cartouches puisse facilement déposer ses échantillons dans chacune des chambres réactionnelles (13). Pour cela, la cartouche peut par exemple posséder un couvercle amovible qui, lorsqu'il est enlevé, donne accès directement aux chambres réactionnelles. De telles cartouches peuvent aussi être pré-chargées et comporter, au niveau des chambres réactionnelles (13), un ou plusieurs réactifs nécessaire(s) à l'amplification et / ou à sa détection.

[0081] Bien entendu, les dispositifs de l'invention mentionnés plus haut peuvent comprendre une ou plusieurs cartouches correspondant à n'importe laquelle des cartouches décrites ci-dessus.

[0082] Dans la réalisation particulière du dispositif de l'invention, où la cartouche est circulaire, les zones distinctes de chauffage de la platine de chauffage (2) sont préférentiellement réparties selon des portions de disque (figure 2A) ou de couronne (figure 2B). Chaque portion peut être chauffée à une température distincte pour porter successivement le contenu des chambres réactionnelles aux températures distinctes souhaitées, grâce aux moyens de déplacement (3) relatifs entre la cartouche (1) et la platine chauffante (2). Afin de limiter les problèmes d'évaporation et de condensation dans la cartouche (1), les thermoblocs sont de préférence suffisamment larges pour chauffer aussi une partie des canaux, comme cela est représenté par exemple à la figure 11, dans le cadre d'une cartouche rectangulaire.

[0083] Il est important de noter que le nombre de zones de chauffage distinctes peut être égal à deux, trois, ou davantage. Par exemple, dans le cas d'une PCR à deux températures, la platine pourra présenter une zone à 95°C pour la dénaturation des acides nucléiques double brin, et une zone à 60°C pour l'hybridation des amorces et l'élongation. Dans le cas d'une PCR à trois températures, la platine présentera une zone à 95°C (dénaturation), une zone entre 40 et 70°C (hybridation des amorces), et une zone à 72°C (élongation). Enfin, la platine peut présenter un nombre de zones supérieur à trois, par exemple pour bloquer provisoirement la réaction à un moment donné de chaque cycle. La platine peut aussi présenter un nombre de zones qui soit un multiple de deux ou trois, de telle façon qu'un tour de la cartouche corresponde à plusieurs cycles PCR. Enfin, il est important de noter que la taille relative des différentes zones de chauffage est avantageusement choisie proportionnellement à la durée d'incubation désirée pour le fluide réactionnel à la température de ladite zone. Ainsi, dans la platine représentée à la figure 2B, le thermobloc 21, dédié à l'étape de dénaturation, a une surface deux fois moindre que celle des thermoblocs destinés aux étapes d'hybridation et d'élongation (blocs 22 et 23, respectivement). En choisissant une vitesse de rotation relative de la cartouche sur la platine telle qu'une rotation de 360° est effectuée en 150 secondes, on obtient donc des cycles dans lesquels la dénaturation dure 30 secondes, l'hybridation 1 minute et l'élongation 1 minute.

[0084] Au sujet des moyens de déplacement on notera que, selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la platine (2) est fixe et la cartouche (1) est mue grâce aux moyens de déplacement (3).

[0085] Toutefois, dans d'autres modes de réalisation, on pourra également prévoir une cartouche fixe et une platine de chauffage mise en mouvement grâce auxdits moyens de déplacement.

[0086] Dans le mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention, selon lequel la cartouche est circulaire, les moyens de déplacement (3) autorisent la mise en rotation de ladite cartouche et/ou de ladite platine.

[0087] On peut prévoir un élément conducteur entre la cartouche et la platine chauffante. Toutefois, selon une variante préférentielle de l'invention, ladite cartouche est en contact direct avec ladite platine chauffante. Dans ce cas, ladite platine est avantageusement pourvue d'un revêtement favorisant le déplacement entre ladite cartouche et ladite platine. Un tel revêtement peut par exemple être constitué en Téflon (marque déposée).

[0088] Comme indiqué ci-dessus, la platine de chauffage du système peut présenter au moins deux ou trois zones pouvant être portées à des températures distinctes. Préférentiellement, cette platine est constituée de deux ou trois blocs thermiques indépendants ("thermoblocs") distincts reliés à des moyens de programmation de leur température. Dans le cas où la platine comporte trois thermoblocs (21 à 23), le premier de ces thermoblocs (21) est chauffé à la température de dénaturation, le deuxième (22) à la température d'hybridation, le troisième (23) à la température d'élongation. L'utilisation de tels thermoblocs de température constante simplifie la réalisation de la platine chauffante.

[0089] Les moyens de déplacement relatif de la cartouche par rapport à la platine pourront être réalisés sous de multiples formes. Selon un mode de réalisation préféré, illustré à la figure 10, la cartouche (1) présente sur le dessous une partie saillante centrale (181) comportant une encoche (182), de telle sorte que la partie saillante (181) s'encastre dans la platine chauffante (2) et relie la cartouche (1) avec les moyens de déplacement (3) au niveau d'un taquet ou axe (32) mis en mouvement par un micromoteur (31). La partie saillante (181) permet donc d'une part, de positionner la cartouche par rapport à une platine (2) telle que celle représentée à la figure 2B, et d'autre part, d'assurer sa liaison avec les moyens de mise en mouvement (3).

[0090] Selon un mode de réalisation alternatif, représenté aux figures 1 et 3, la cartouche présente au moins une oreille (183) et les moyens de déplacement (3) incluent au moins un axe (32) coopérant avec ladite oreille pour inculquer à ladite cartouche un mouvement rotatif.

[0091] Le mode de déplacement relatif entre la platine et la cartouche pourra varier selon les modes de réalisation. Il pourra s'agir d'un déplacement à vitesse continu ou par à-coups. La vitesse de déplacement pourra être constante ou varier dans le temps.

[0092] Avantageusement, le système selon invention comprend également des moyens optiques d'excitation/mesure de la fluorescence, prévus par exemple au-dessus ou sur le côté de ladite cartouche. Selon une variante préférentielle de l'invention, ces moyens constitueront un système unique et fixe. Un avantage d'une variante préférentielle de l'invention selon laquelle la cartouche est circulaire et mue selon un déplacement rotatif est de pouvoir amener successivement chaque chambre réactionnelle sous ledit système optique, réduisant ainsi sa complexité. Un système de repérage, situé par exemple sur la cartouche (1), permet de déterminer à chaque instant que la chambre réactionnelle est située en regard du système optique.

[0093] Les moyens d'amenée du fluide présent dans ledit réservoir vers lesdites chambres réactionnelles peuvent être réalisés sous différentes formes. Comme cela a été décrit plus haut, on peut distinguer deux catégories de modes d'adressage du fluide vers les chambres réactionnelles : l'adressage en système ouvert, qui suppose une augmentation de pression au niveau du réservoir et la présence d'évents (14) au niveau des chambres réactionnelles, et l'adressage en système clos, qui débute au contraire par l'établissement d'une dépression dans la cartouche (1), suivi d'un rétablissement de cette pression.

[0094] Les moyens (4) d'amenée du fluide dans les chambre réactionnelles diffèrent suivant le mode de réalisation choisi. Ainsi, en système ouvert, le fluide contenu dans le réservoir est distribué sous pression dans les chambres réactionnelles de façon à permettre un remplissage uniforme de ces chambres. Dans ce cas, les moyens d'amenée (4) incluent préférentiellement un dispositif à piston (41) dont la vitesse de pénétration dans le réservoir sera calculée pour favoriser le bon remplissage des chambres réactionnelles. Alternativement, ces moyens d'amenée incluent une pompe branchée de façon à augmenter la pression dans le réservoir (11).

[0095] Comme il a été vu plus haut, une autre variante préférée de l'invention implique de travailler en système clos. Le fluide contenu dans le réservoir est alors distribué dans les chambres réactionnelles de la façon suivante : dans un premier temps, une dépression est créée à l'intérieur de la cartouche, le cas échéant par un dispositif à piston ou une pompe (42), branchée cette fois de manière à diminuer la pression dans la cartouche (1). La pression est ensuite rétablie, ce qui permet au fluide de s'engager dans les canaux et de remplir les chambres réactionnelles périphériques.

[0096] L'invention concerne également tout procédé d'amplification d'acide nucléique grâce à un système tel que décrit ci-dessus, **caractérisé en ce qu'il** comprend les étapes consistant à :

- remplir au moins partiellement le réservoir (11) avec un fluide contenant un échantillon d'acides nucléiques à analyser ainsi que tout le nécessaire à une réaction d'amplification, à l'exception des amorces, et facultativement, un intercalant fluorescent des acides nucléiques ;
- répartir ledit fluide dans les chambres réactionnelles (13) prévues dans la cartouche (1), dans lesquelles sont pré-réparties des amorces et, facultativement, une ou plusieurs sondes marquées spécifiques de la séquence nucléique cible ;
- mettre en oeuvre les moyens de déplacement relatif entre la cartouche et la platine chauffante pour amener successivement, et autant - de fois que désiré, le contenu de chaque chambre aux températures définies par les deux, trois ou davantage zones de ladite platine de chauffage.

[0097] Dans une variante du procédé ci-dessus, des réactifs nécessaires à la réaction d'amplification et/ou à la détection des produits de l'amplification, et distincts des amorces et des sondes, sont pré-répartis dans les chambres réactionnelles (13) de la cartouche (1). Le fluide introduit dans le réservoir (11) ne contient alors pas ces réactifs.

[0098] L'étape de répartition du fluide dans les chambres réactionnelles (13) est effectuée soit en appliquant une dépression à l'intérieur de la cartouche, puis en rétablissant la pression (système clos), soit en augmentant la pression au niveau du réservoir (11), à condition que les chambres réactionnelles soient pourvues d'évents (système ouvert).

[0099] L'invention, ainsi que les différents avantages qu'elle présente, seront mieux compris grâce à la description qui va suivre de quelques modes non limitatifs de réalisation de celle-ci, illustrés dans les figures.

Exemple 1 : mode de réalisation simplifié du dispositif de l'invention.

[0100] Le système de détection et de quantification de séquences nucléiques cibles représentés à la figure 1 comprend une cartouche circulaire en matière plastique de 2 mm d'épaisseur présentant un diamètre de 5 cm. Cette cartouche (1) est pourvue d'un réservoir central (11) et sera décrite plus en détails en référence ci-après aux figures 3 et 4. La capacité du réservoir est, dans le cadre du présent mode de réalisation, de 400 μ l. Son plancher est plat mais on notera que dans d'autres modes de réalisation il pourra être bombé pour faciliter le passage du fluide vers les chambres sans

formation de bulles d'air, notamment en fin d'adressage lorsque le réservoir est quasiment vide.

[0101] Le système comprend par ailleurs une platine chauffante (2) en contact direct avec la face inférieure de la cartouche (1) et des moyens de déplacement (3) de la cartouche (1) par rapport à la platine chauffante (2). Ces moyens de déplacement incluent un micromoteur (31) relié à deux axes (32) qui coopèrent avec deux oreilles (183) de la cartouche (1) pour inculquer à celle-ci un mouvement rotatif sur la platine chauffante (2), celle-ci restant quant à elle fixe.

[0102] Le système décrit comprend également un piston (41) destiné à coopérer avec ledit réservoir (11) ainsi qu'un dispositif optique (5) d'excitation/mesure de fluorescence (source émettrice permettant une excitation à une longueur d'onde donnée et programmable et récepteur de la fluorescence émise) fixe et placé au dessus de la cartouche (1) et de la platine chauffante (2).

[0103] Comme on peut le voir sur la figure 2A, la platine chauffante (2) est constituée de trois blocs métalliques (21, 22 et 23) (ci-après dénommés thermoblocs) en forme de portions de disques. On notera que dans ce mode de réalisation, ces thermoblocs présentent sensiblement la même taille mais que, dans d'autres modes de réalisation, ils pourront présenter une taille différente, la taille étant entendue comme la surface angulaire occupée en vue de dessus. Chaque thermobloc (21, 22 et 23) est conçu pour pouvoir être amené à une température constante et programmable, correspondant à l'une des phases (dénaturation, hybridation ou élongation) des cycles d'amplification (PCR), soit généralement respectivement 94°C pour la dénaturation, 72°C pour l'élongation, et entre 30-40 et 65-70°C pour l'hybridation selon le T_m (température d'hybridation) des amorces utilisées. Les températures des thermoblocs pourront être contrôlées par tous moyens connus de l'homme de l'art.

[0104] En référence à la figure 3, la cartouche (1) est pourvue d'un réservoir central (11) de capacité 400 µl relié à 36 chambres réactionnelles (13) par autant de canaux (12), réparties uniformément sur toute la périphérie de la cartouche (sur la figure 3, on n'a pas représenté l'ensemble des canaux et des chambres mais seulement certains d'entre eux). Ces chambres réactionnelles (13) sont par ailleurs pourvues d'évents (14) abouchant sur le bord de la cartouche (1). Dans le présent mode de réalisation, les canaux présentent un diamètre de 0,2 mm et le volume des chambres réactionnelles est de 2,5 microlitres. Dans d'autres modes de réalisation, ce diamètre et ce volume pourront bien sûr être différents.

[0105] Comme déjà précisé, cette cartouche (1) est également pourvue de deux oreilles (183) percées chacune d'un orifice pour laisser passer un axe (32) relié au micromoteur (31).

[0106] Selon la figure 4, les chambres réactionnelles présentent une profondeur de 1 mm. Leur plancher présente une épaisseur de 0,2 mm environ. Cette épaisseur est suffisamment faible pour faciliter de bons échanges thermiques entre les chambres (13) et les thermoblocs (21, 22 et 23). Les chambres réactionnelles (13) sont fermées dans leur partie supérieure par une paroi (17) transparente, formant également la paroi du réservoir (11).

[0107] L'utilisation du dispositif représenté est la suivante :

Le réservoir central (11) est destiné à recevoir l'échantillon d'acides nucléiques à analyser ainsi que tout le nécessaire à une réaction d'amplification, et facultativement un intercalant fluorescent des acides nucléiques (l'ensemble est ci-après dénommé fluide), à l'exception des amorces préréparties dans chaque chambre réactionnelle périphérique.

[0108] Dans le cadre du présent mode de réalisation, l'utilisateur place dans le réservoir central 90 µl (c'est-à-dire 36 fois 2,5 µl) de fluide, dont 75 ng d'acides nucléiques. Les concentrations en réactifs dudit fluide sont les suivantes :

dNTP : 200 µM
 Tampon Taq : 1 x
 MgCl₂ : 1,5 mM
 Taq : 4U
 SybrGreen (marque déposée) : 1 x
 H₂O : qsp

[0109] Chaque chambre 10, sauf quelques-unes à des fins de témoins négatifs, contient deux amorces spécifiques d'une séquence cible à amplifier, et facultativement une ou plusieurs sondes marquées, permettant une mesure spécifique ultérieure de fluorescence. Dans le présent mode de réalisation, ont été répartis 10 ng de chaque amorce dans chaque chambre sauf dans celles servant de témoin négatif.

[0110] Après avoir rempli partiellement le réservoir (11) avec le fluide dont le volume est égal à la somme des volumes des chambres (le volume d'une chambre est défini comme étant le produit de sa surface de "plancher" par sa profondeur), le piston (41) est actionné pour distribuer ce fluide dans la pluralité de chambres réactionnelles (13). Ce piston permet d'augmenter la pression au sein du réservoir (11) et permet le passage du fluide dans les canaux vers les chambres. La vitesse de déplacement du piston dans le réservoir est d'environ 1 mm par seconde et ledit déplacement est stoppé à un niveau qui dépend du volume de fluide à adresser dans les chambres.

[0111] Le faible diamètre des canaux (12) permet d'empêcher la diffusion du fluide depuis le réservoir (11) vers les canaux (12) et les chambres (13) sous l'effet de la gravité (à cette échelle, les processus habituellement négligeables comme les forces de capillarité deviennent prégnants, et dans le cas présent suffisent à maintenir le fluide dans le réservoir). Grâce aux événements (14), l'air présent dans les chambres (13) est évacué, ce qui assure le remplissage de celles-ci.

[0112] Les thermoblocs (21, 22, 23) sont portés aux trois températures correspondant aux trois températures des phases de la PCR (ou à des températures légèrement supérieures compte tenu des éventuelles déperditions thermiques entre la platine chauffante (2) et la cartouche (1) et les moyens de déplacement (3) sont mis en œuvre de façon à animer d'un mouvement giratoire la cartouche (1) pour faire passer successivement et autant de fois que désiré chaque chambre réactionnelle au-dessus des trois thermoblocs.

[0113] Plus précisément, le bloc (21) est porté à la température correspondant à la phase de dénaturation (94°C), le thermobloc (22) est porté à la température correspondant à la phase d'hybridation (36°C) et le thermobloc (23) est porté à la température correspondant à la phase d'élongation (72°C).

[0114] Dans le présent mode de réalisation, le micromoteur (31) des moyens de déplacement (3) est conçu pour inculquer une rotation de 10 degrés toutes les 2,5 secondes à la cartouche (1) (soit un cycle de PCR en 1,5 mn). Toutefois, dans d'autres modes de réalisation, ce mouvement pourra présenter une vitesse différente et être continu au lieu d'être saccadé.

[0115] On notera que le dispositif optique (5) est prévu au-dessus du bloc correspondant 23 porté à une température correspondant à la température d'élongation, et plus particulièrement à un emplacement qui correspond à la fin de la phase d'élongation. Bien entendu, le dispositif optique (5) peut être placé à un emplacement différent, choisi notamment en fonction de la chimie utilisée. Par exemple, en utilisant la chimie TaqMan™ ou de la fluorescence non spécifique, il est logique d'effectuer la mesure à la fin de la phase d'élongation, comme décrit ci-dessus. En revanche, l'utilisation d'une chimie du type Molecular Beacons™ implique que la mesure se fasse plutôt au moment de l'hybridation.

[0116] Le système présenté permet de remplir rapidement et de façon reproductible une grande quantité de chambres réactionnelles et d'effectuer sur le contenu de celles-ci une PCR et des mesures de fluorescence à chaque cycle de la PCR.

[0117] Le mode de réalisation ici décrit n'a pas pour objet de réduire la portée de l'invention. Il pourra donc y être apporté de nombreuses modifications sans sortir du cadre de celle-ci.

Exemple 2 : Cartouche circulaire améliorée

[0118] Les figures 5 à 10 représentent un exemple de cartouche circulaire présentant certaines modifications par rapport à la cartouche de l'exemple 1.

[0119] Cette cartouche est prévue pour une utilisation en système clos, c'est-à-dire que les chambres réactionnelles (13) n'ont pas d'autre ouverture que l'arrivée du canal (12). La cartouche est constituée de deux éléments qui s'emboîtent l'un dans l'autre : la partie inférieure, ou socle, est représentée aux figures 5 et 6, et la partie supérieure, ou couvercle, est représentée aux figures 7 et 8. L'assemblage des deux est illustré aux figures 9 et 10.

[0120] Le chargement de cette cartouche s'effectue de la façon suivante :

L'utilisateur place dans le réservoir central l'extrait d'acides nucléiques à analyser. Il place le consommable dans l'automate. Ce dernier crée une dépression à l'intérieur de la cartouche ($P = 0,05$ bar approximativement), par exemple par l'utilisation d'une pompe (42). La pression est ensuite rétablie, ce qui permet aux fluides de s'engager dans les canaux et de remplir les chambres réactionnelles périphériques. Ainsi, par rapport au dispositif de l'exemple 1, le fluide n'est plus adressé par une augmentation de la pression mais par dépression, ce qui présente l'avantage de ne pas nécessiter d'événement et donc de travailler en système clos.

[0121] Le cas échéant, on peut prévoir plusieurs sous-réservoirs et non plus un réservoir unique, ce qui présente l'avantage de traiter simultanément plusieurs échantillons.

[0122] Le fond du réservoir a une forme conique permettant au fluide de se répartir à sa périphérie, c'est-à-dire près de l'entrée des canaux.

[0123] À la jonction entre les canaux et le réservoir, se trouve un système anti-reflux, constitué par une portion de canal vertical (123), ce qui, d'une part, prévient les contaminations croisées en cas de retour intempestif de fluide vers la partie centrale ou au cas où tout le fluide ne se serait pas engagé dans le canal et, d'autre part, permet une fois l'adressage effectué mais avant la PCR, de venir boucher les canaux au moyen d'un bouchon dont les dentelures viennent épouser ces entrées verticales, afin de travailler en système clos (pas de contamination, pas d'évaporation).

[0124] La cartouche est en plastique, préférentiellement en polycarbonate car ce polymère présente des caractéristiques physiques, optiques et de comportement thermique intéressantes.

[0125] La taille des canaux est par exemple de 0,4 x 0,2 mm (demi-lune) en section.

[0126] La taille du consommable est par exemple de 100 mm (diamètre), le nombre de chambres est de 80, le nombre de sous-réservoirs est compris entre 1 et 8.

[0127] Comme illustré à la figure 10, la cartouche (1) présente sur le dessous une partie saillante centrale (181) comportant une encoche (182), de telle sorte que la partie saillante (181) s'encastre dans la platine chauffante (2) et relie la cartouche (1) avec les moyens de déplacement (3) au niveau d'un taquet ou axe (32) mis en mouvement par un micromoteur (31). La partie saillante (181) permet donc d'une part, de positionner la cartouche par rapport à une platine (2) telle que celle représentée à la figure 2B, et d'autre part, d'assurer sa liaison avec les moyens de mise en mouvement (3).

[0128] Les chambres réactionnelles sont chargées avec des amorces spécifiques de séquences cibles et, le cas échéant, avec des sondes de type TaqMan™ ou autre spécifiques desdites cibles. Suivant les applications, les cibles seront des gènes viraux ou bactériens, des jonctions entre un transgène et le génome d'une plante pour détecter et/ou identifier certains OGM, etc.

[0129] Une variante de la cartouche décrite ci-dessus, comportant 36 chambres réactionnelles d'un volume de 8 µl et des canaux d'un diamètre de 0,3 mm, a été utilisée pour effectuer un test de détection de bactéries Salmonelles. 288 µl (soit 36 fois 8 µl) de la solution suivante ont été placés dans le réservoir central :

DUTP 400 µM

dNTP : 200 µM

Tampon Taq : 1 x

MgCl₂ : 3 mM

Taq: 15 U

TWEEN (marque déposée) : 0,007 %

SybrGreen (marque déposée) : 0,1 x

ADN génomique de Salmonella enteritidis : 1 ng

H₂O : qsp

1,6 picomole des amorces FinA1 et FinA2 décrites dans Cohen, Mechanda et al. 1996 ont été déposées dans les chambres réactionnelles.

[0130] Cette expérience a donné des résultats positifs, comme attendu.

Revendications

1. Cartouche réactionnelle comportant plusieurs chambres réactionnelles (13), un réservoir (11) et des canaux (12), la cartouche (1) présentant les caractéristiques suivantes :

- la cartouche possède une géométrie de révolution, dans laquelle le réservoir (11) est placé sensiblement au centre de ladite cartouche, les chambres réactionnelles (13) sont réparties en cercle autour dudit réservoir, et les canaux (12) reliant ledit réservoir aux dites chambres sont essentiellement radiaux;

- la jonction entre les canaux (12) et le réservoir (11) se fait à la périphérie du réservoir;

la cartouche réactionnelle étant **caractérisée en ce que**;

- chaque chambre réactionnelle est reliée au réservoir par un canal (12) ayant une section droite comprise dans un cercle de diamètre inférieur à 3 mm;

- la capacité du réservoir est inférieure à 10 ml; et

- le fond du réservoir est convexe, de façon à assurer la répartition d'un fluide contenu dans le réservoir au niveau de l'entrée des canaux.

2. Cartouche selon la revendication 1, dans laquelle le diamètre des canaux (12) est inférieur ou égal à 0,2 mm.

3. Cartouche selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle la capacité du réservoir (11) est comprise entre 0,1 ml et 1 ml.

4. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, **caractérisée en ce qu'elle** comprend entre 20 et 500 chambres réactionnelles.

5. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, **caractérisée en ce que** le volume des chambres réactionnelles est compris entre 0,2 et 50 µl, de préférence entre 1 et 10 µl.

6. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle le fond du réservoir (11) est conique.

EP 1 305 115 B1

7. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans laquelle les chambres réactionnelles (13) sont placées à la périphérie de ladite cartouche.
- 5 8. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, présentant un diamètre compris entre 1 et 10 cm.
9. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans laquelle le réservoir (11) est divisé en 2 à 8 sous-réservoirs (111 à 118), et chacune des chambres réactionnelles (13) est reliée à un seul de ces sous-réservoirs par un canal (12).
- 10 10. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans laquelle les chambres réactionnelles présentent une profondeur comprise entre 0,5 et 1,5 mm.
11. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, **caractérisée en ce qu'elle** est en matière plastique, et de préférence en polycarbonate.
- 15 12. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dont l'épaisseur est comprise entre 0,5 et 5 mm.
13. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans laquelle le plancher des chambres réactionnelles (13) présente une épaisseur comprise entre 0,05 et 0,5 mm, de préférence environ 0,25 mm.
- 20 14. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans laquelle les chambres réactionnelles (13) sont fermées par une paroi supérieure transparente (17).
- 25 15. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, dans laquelle les chambres réactionnelles (13) sont pourvues d'évents (14).
16. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, dans laquelle les chambres réactionnelles (13) sont closes.
- 30 17. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans laquelle le réservoir (11) comporte une ouverture adaptable à des moyens (4) de modulation de la pression dans ledit réservoir.
- 35 18. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, dans laquelle chaque canal (12) est constitué d'au moins deux parties de diamètres différents (121 et 122), le diamètre de la deuxième partie (122) étant inférieur à celui de la première partie (121), de façon à créer une perte de charge dans le canal (12).
- 40 19. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, **caractérisée en ce que** chaque canal (12) est équipé d'une cavité anti-reflux (123) au niveau de sa jonction avec le réservoir (11), ladite cavité anti-reflux étant constituée d'une portion de canal sensiblement verticale, d'un diamètre supérieur ou égal à celui du canal (12).
- 45 20. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, dans laquelle une partie au moins des chambres réactionnelles (13) comporte des oligonucléotides.
21. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, dans laquelle chacune des chambres réactionnelles (13) comporte deux amorces spécifiques d'une séquence d'acide nucléique à amplifier et, facultativement, une sonde marquée spécifique de ladite séquence.
- 50 22. Cartouche selon l'une quelconque des revendications 1 à 21, dans laquelle au moins une partie des chambres réactionnelles (13) comportent des réactifs qui y ont été chargés par dépôt liquide suivi d'un séchage, de telle sorte que l'arrivée d'un fluide dans lesdites chambres réactionnelles remette lesdits réactifs en solution.
23. Dispositif pour effectuer des réactions enzymatiques et/ou de biologie moléculaire nécessitant au moins deux températures d'incubation différentes, **caractérisé en ce qu'il** comprend :
- 55 - au moins une cartouche (1) selon l'une quelconque des revendications 1 à 22;
- au moins une platine de chauffage (2) présentant au moins deux zones distinctes pouvant être portées à au moins deux températures différentes;
- des moyens (3) de déplacement relatif entre ladite cartouche et ladite platine, permettant une variation cyclique

de la température des chambres réactionnelles.

24. Dispositif selon la revendication 23, dans lequel la réaction enzymatique est une amplification en chaîne thermo-dépendante de séquences d'acides nucléiques, et dans lequel les zones de la platine de chauffage (2) peuvent être portées à au moins deux températures différentes, correspondant aux phases des cycles d'amplification desdits acides nucléiques.

25. Dispositif selon la revendication 24, **caractérisé en ce que** :

- des amorces spécifiques de séquences cibles à amplifier sont pré-réparties dans les chambres réactionnelles (13),
- le réservoir (11) est destiné à recevoir un fluide composé notamment d'un échantillon d'acides nucléiques à analyser et des réactifs nécessaires à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase, à l'exception des amorces,
- la platine de chauffage (2) présente trois zones distinctes pouvant être portées à trois températures différentes, correspondant aux trois phases des cycles d'amplification en chaîne par polymérase.

26. Dispositif selon la revendication 24 ou 25, pour l'amplification en chaîne thermo-dépendante de séquences d'acides nucléiques mesurée en temps réel, **caractérisé en ce qu'il** comprend des moyens optiques (5) d'excitation / mesure de la fluorescence, disposés de manière à exciter et mesurer à chaque cycle la fluorescence du contenu des chambres réactionnelles.

27. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 23 à 26, dans lequel les zones distinctes de chauffage de la platine (2) sont réparties selon au moins deux ou trois portions de disque.

28. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 23 à 27, dans lequel ladite platine de chauffage (2) est fixe et ladite cartouche (1) est mue grâce aux dits moyens de déplacement (3).

29. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 23 à 27, dans lequel ladite cartouche (1) est fixe et ladite platine de chauffage (2) est mue grâce aux dits moyens de déplacement (3).

30. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 23 à 29, dans lequel lesdits moyens de déplacement (3) autorisent la mise en rotation de ladite cartouche (1) et/ou de ladite platine de chauffage (2).

31. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 23 à 30, dans lequel la cartouche (1) est en contact direct avec la platine chauffante (2).

32. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 23 à 31, dans lequel la platine (2) est pourvue d'un revêtement favorisant le déplacement relatif entre ladite cartouche (1) et ladite platine (2).

33. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 23 à 32, dans lequel la platine chauffante (2) comporte deux ou trois thermoblocs distincts (21, 22 et le cas échéant, 23) reliés à des moyens de programmation de leur température.

34. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 23 à 33, dans lequel la cartouche (1) présente sur le dessous une partie saillante centrale (181) comportant une encoche (182), et les moyens de déplacement (3) incluent au moins un taquet (32) coopérant avec ladite encoche (182) pour inculquer à ladite cartouche (1) un mouvement rotatif.

35. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 23 à 34, comportant des moyens optiques (5) d'excitation / mesure de la fluorescence disposés au-dessus ou sur le côté de la cartouche.

36. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 23 à 35, comportant en outre des moyens (4) permettant d'amener le fluide présent dans le réservoir (11) dans les chambres réactionnelles (13).

37. Dispositif selon la revendication 36, dans lequel lesdits moyens d'amenée (4) incluent un dispositif à piston (41), et le fluide est amené dans les chambres réactionnelles par une augmentation de pression.

38. Dispositif selon la revendication 36, dans lequel lesdits moyens d'amenée (4) incluent une pompe (41), et le fluide

est amené dans les chambres réactionnelles par un rétablissement de la pression après l'établissement d'une dépression.

39. Dispositif selon la revendication 38, dans lequel les chambres réactionnelles (13) de la cartouche (1) sont closes.

40. Procédé d'amplification d'acide nucléique grâce à un dispositif selon l'une quelconque des revendications 23 à 39, comportant les étapes suivantes :

- remplir au moins partiellement le réservoir (11) avec un fluide contenant un échantillon d'acides nucléiques à analyser, ainsi que tout le nécessaire à une réaction d'amplification à l'exception des amorces et, le cas échéant, un intercalant fluorescent des acides nucléiques;
- répartir ledit fluide dans les chambres réactionnelles (13) de la cartouche (1), dans lesquelles sont prédéposées des amorces et, le cas échéant, une ou plusieurs sondes marquées ;
- mettre en oeuvre les moyens (3) de déplacement relatif entre la cartouche et la platine chauffante pour amener successivement et autant de fois que désiré le contenu de chaque chambre réactionnelle aux deux, trois ou davantage températures définies par les deux, trois ou davantage zones de ladite platine de chauffage (2).

41. Procédé d'amplification selon la revendication 40, dans lequel l'étape de répartition du fluide dans les chambres réactionnelles (13) est effectuée en appliquant une dépression à l'intérieur de la cartouche, puis en rétablissant la pression.

42. Procédé de remplissage en système clos des chambres réactionnelles (13) d'une cartouche (1) selon la revendication 17, comportant les étapes suivantes :

- remplir au moins partiellement le réservoir (11) avec un fluide,
- connecter la cartouche (1) aux moyens (4) de modulation de la pression,
- appliquer une dépression à l'intérieur de la cartouche, puis rétablir la pression.

Claims

1. Reaction cartridge comprising a plurality of reaction chambers (13), a reservoir (11) and channels (12), the cartridge (1) having the following characteristics:

- the cartridge has a geometry of revolution, in which the reservoir (11) is placed substantially at the centre of said cartridge, the reaction chambers (13) are distributed in a circle around said reservoir, and the channels (12) connecting said reservoir to said chambers are essentially radial;
- the junction between the channels (12) and the reservoir (11) is formed at the periphery of the reservoir; the reaction cartridge being **characterized in that**
- each reaction chamber is connected to the reservoir via a channel (12) having a cross section included in a circle with a diameter of less than 3 mm;
- the capacity of the reservoir is less than 10 ml; and
- the base of the reservoir is convex, to ensure distribution of a fluid contained in the reservoir to the inlet to the channels.

2. Cartridge according to claim 1, in which the diameter of the channels (12) is 0.2 mm or less.

3. Cartridge according to claim 1 or 2, in which the capacity of the reservoir (11) is in the range of 0.1 ml to 1 ml.

4. Cartridge according to any one of claims 1 to 3, **characterized in that** it comprises 20 to 500 reaction chambers.

5. Cartridge according to any one of claims 1 to 4, **characterized in that** the volume of the reaction chambers is in the range of 0.2 μ l to 50 μ l, preferably in the range of 1 μ l to 10 μ l.

6. Cartridge according to any one of claims 1 to 5, in which the base of the reservoir (11) is conical.

7. Cartridge according to any one of claims 1 to 6, in which the reaction chambers (13) are placed at the periphery of said cartridge.

8. Cartridge according to any one of claims 1 to 7, with a diameter in the range of 1 to 10 cm.
9. Cartridge according to any one of claims 1 to 8, in which the reservoir (11) is divided into 2 to 8 sub-reservoirs (111 to 118), and each of the reaction chambers (13) is connected to just one of said sub-reservoirs via a channel (12).
10. Cartridge according to any one of claims 1 to 9, in which the depth of the reaction chambers is in the range of 0.5 to 1.5 mm.
11. Cartridge according to any one of claims 1 to 10, **characterized in that** it is produced from a plastics material, preferably polycarbonate.
12. Cartridge according to any one of claims 1 to 11, the thickness of which is in the range of 0.5 to 5 mm.
13. Cartridge according to any one of claims 1 to 12, in which the floor of the reaction chambers (13) is in the range of 0.05 to 0.5 mm thick, preferably about 0.25 mm thick.
14. Cartridge according to any one of claims 1 to 13, in which the reaction chambers (13) are closed by an upper transparent wall (17).
15. Cartridge according to any one of claims 1 to 14, in which the reaction chambers (13) are provided with vents (14).
16. Cartridge according to any one of claims 1 to 14, in which the reaction chambers (13) are closed.
17. Cartridge according to any one of claims 1 to 16, in which the reservoir (11) comprises an opening that can be adapted to means (4) for adjusting the pressure in said reservoir.
18. Cartridge according to any one of claims 1 to 17, in which each channel (12) is constituted by at least two portions of different diameters (121 and 122), the diameter of the second portion (122) being less than that of the first portion (121), so as to create a pressure drop in the channel (12).
19. Cartridge according to any one of claims 1 to 18, **characterized in that** each channel (12) is provided with an anti-reflux cavity (123) at its junction with the reservoir (11), said anti-reflux cavity being constituted by a substantially vertical channel portion with a diameter that is equal to or greater than that of the channel (12).
20. Cartridge according to any one of claims 1 to 19, in which at least a portion of the reaction chambers (13) comprises oligonucleotides.
21. Cartridge according to any one of claims 1 to 20, in which each reaction chamber (13) comprises two primers specific for a nucleic acid sequence to be amplified and, optionally, a labelled probe specific for said sequence.
22. Cartridge according to any one of claims 1 to 21, in which at least a portion of the reaction chambers (13) contains reagents that are deposited therein by depositing a liquid followed by drying, such that the arrival of a fluid in said reaction chambers takes said reagents up into solution again.
23. Device for carrying out enzymatic and/or molecular biological reactions requiring at least two different incubation temperatures, **characterized in that** it comprises:
 - at least one cartridge (1) according to any one of claims 1 to 22;
 - at least one heating plate (2) having at least two distinct zones that can be heated to at least two different temperatures;
 - means (3) for relative displacement between said cartridge and said plate, allowing a cyclic variation of the temperature of the reaction chambers.
24. Device according to claim 23, in which the enzymatic reaction is thermodependent chain amplification of nucleic acid sequences, and in which the zones of the heating plate (2) can be heated to at least two different temperatures, corresponding to phases in the nucleic acid amplification cycles.
25. Device according to claim 24, **characterized in that:**

- primers specific for the target sequences to be amplified are pre-distributed in the reaction chambers (13),
- the reservoir (11) is intended to receive a fluid composed of a sample of nucleic acids to be analysed and the reagents required for a polymerase chain amplification reaction, with the exception of primers,
- the heating plate (2) comprises three distinct zones that can be heated to three different temperatures corresponding to the three phases of polymerase chain reaction amplification cycles.

26. Device according to claim 24 or 25, for real-time thermodependent chain amplification of nucleic acid sequences, **characterized in that** it comprises optical means (5) for fluorescence excitation/measurement, disposed so as to excite and measure the fluorescence of the contents of the reaction chambers in each cycle.

27. Device according to any one of claims 23 to 26, in which the distinct zones for heating the plate (2) are distributed into at least two or three disk portions.

28. Device according to any one of claims 23 to 27, in which said heating plate (2) is fixed and said cartridge (1) is moved by means of displacement means (3).

29. Device according to any one of claims 23 to 27, in which said cartridge (1) is fixed and said heating plate (2) is moved by means of displacement means (3).

30. Device according to any one of claims 23 to 29, in which said displacement means (3) allow rotation of said cartridge (1) and/or said heating plate (2).

31. Device according to any one of claims 23 to 30, in which the cartridge (1) is in direct contact with the heating plate (2).

32. Device according to any one of claims 23 to 31, in which the plate (2) is provided with a coating promoting relative displacement between said cartridge (1) and said plate (2).

33. Device according to any one of claims 23 to 32, in which the heating plate (2) comprises two or three distinct thermoblocks (21, 22 and, if necessary, 23) connected to means for programming their temperature.

34. Device according to any one of claims 23 to 33, in which the bottom of the cartridge (1) has a central projecting portion (181) comprising a notch (182), and the displacement means (3) include at least one driver (32) co-operating with said notch (182) to cause said cartridge (1) to move in a rotary motion.

35. Device according to any one of claims 23 to 34, comprising optical means (5) for fluorescence excitation/measurement disposed above or to the side of the cartridge.

36. Device according to any one of claims 23 to 35, further comprising means (4) for supplying fluid present in the reservoir (11) to the reaction chambers (13).

37. Device according to claim 36, in which said supply means (4) include a piston device (41), and the fluid is supplied to the reaction chambers by increasing the pressure.

38. Device according to claim 36, in which said supply means (4) include a pump (41), and the fluid is supplied to the reaction chambers by re-establishing the pressure after establishing an underpressure.

39. Device according to claim 38, in which the reaction chambers (13) of the cartridge (1) are closed.

40. Method for amplifying a nucleic acid using a device according to any one of claims 23 to 39, comprising the following steps:

- at least partially filling the reservoir (11) with a fluid containing a sample of nucleic acids to be analysed and the components required for carrying out an amplification reaction, with the exception of primers, and, optionally, a fluorescent nucleic acid reporter;
- distributing said fluid to the reaction chambers (13) of the cartridge (1), in which are located the primers and, optionally, one or more labelled probes;
- employing means (3) for relative displacement between the cartridge and the heating plate to successively bring the contents of each reaction chamber to the two, three or more temperatures defined by the two, three

or more zones of said heating plate (2) as many times as is desired.

41. Amplification method according to claim 40, in which the step for distributing fluid to the reaction chambers (13) is carried out by applying an underpressure inside the cartridge, then re-establishing the pressure.

42. Process for closed system filling of reaction chambers (13) in a cartridge (1) according to claim 17, comprising the following steps:

- at least partially filling the reservoir (11) with a fluid,
- connecting the cartridge (1) to means (4) for adjusting the pressure,
- applying an underpressure inside the cartridge, then re-establishing the pressure.

Patentansprüche

1. Reaktionskartusche mit mehreren Reaktionskammern (13), einem Behälter (11) und Kanälen (12), wobei die Kartusche (1) die folgenden Merkmale aufweist:

- die Kartusche weist eine Rotationsgeometrie auf, wobei der Behälter (11) im Wesentlichen in der Mitte der Kartusche angeordnet ist, die Reaktionskammern (13) kreisförmig um den Behälter verteilt sind und die Kanäle (12) zur Verbindung des Behälters mit den Kammern im Wesentlichen radial sind;
- die Verbindung zwischen den Kanälen (12) und dem Behälter (11) erfolgt am Umfang des Behälters; wobei die Reaktionskartusche **dadurch gekennzeichnet ist, dass** jede Reaktionskammer mit dem Behälter durch einen Kanal (12) verbunden ist, der einen Querschnitt aufweist, der in einem Kreis mit einem Durchmesser kleiner als 3 mm enthalten ist, der Rauminhalt des Behälters kleiner als 10 ml ist und der Boden des Behälters konvex ist, derart, dass er die Verteilung des in dem Behälter enthaltenen Fluids im Bereich des Eingangs der Kanäle bewirkt.

2. Kartusche nach Anspruch 1, wobei der Durchmesser der Kanäle (12) kleiner oder gleich 0,2 mm ist.

3. Kartusche nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Rauminhalt des Behälters (11) zwischen 0,1 ml und 1 ml beträgt.

4. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie zwischen 20 und 500 Reaktionskammern enthält.

5. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Fassungsvermögen der Reaktionskammern zwischen 0,2 und 50 µl, vorzugsweise zwischen 1 und 10 µl beträgt.

6. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Boden des Behälters (11) konisch ist.

7. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Reaktionskammern (13) am Umfang der Kartusche angeordnet sind.

8. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 7, einen Durchmesser zwischen 1 und 10 cm aufweisend.

9. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Behälter (11) in 2 bis 8 Unterbehälter (111 bis 118) unterteilt ist und jede der Reaktionskammern (13) mit nur einem dieser Unterbehälter durch einen Kanal (12) verbunden ist.

10. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Reaktionskammern eine Tiefe zwischen 0,5 und 1,5 mm aufweise.

11. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie aus Kunststoff, vorzugsweise aus Polycarbonat ist.

12. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 11, deren Dicke zwischen 0,5 und 5 mm beträgt.

13. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei der Boden der Reaktionskammern (13) eine Dicke zwischen 0,5 und 5 mm, vorzugsweise ungefähr 0,25 mm aufweist.

14. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Reaktionskammern (13) durch eine transparente obere Wand (17) geschlossen sind.
- 5 15. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Reaktionskammern (13) mit Lüftungslöchern (14) versehen sind.
16. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Reaktionskammern (13) verschlossen sind.
- 10 17. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei der Behälter (11) eine Öffnung aufweist, die an Mittel (4) zur Modulierung des Drucks in dem Behälter anpassbar ist.
18. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei jeder Kanal (12) von zumindest zwei Bereichen mit unterschiedlichen Durchmessern (121 und 122) gebildet ist, wobei der Durchmesser des zweiten Bereichs (122) kleiner als der des ersten Bereichs (121) ist, derart, dass ein Druckabfall in dem Kanal (12) erzeugt wird.
- 15 19. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 18, **dadurch gekennzeichnet, dass** jeder Kanal (12) mit einem Rückschlagshohlraum (123) im Bereich seiner Verbindung mit dem Behälter (11) versehen ist, wobei dieser Rückschlagshohlraum von einem im Wesentlichen vertikalen Kanalabschnitt mit einem Durchmesser größer oder gleich dem des Kanals (12) gebildet ist.
- 20 20. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei ein Teil zumindest der Reaktionskammern (13) Oligonukleotide aufweist.
- 25 21. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei jede der Reaktionskammern (13) zwei spezifische Initiatoren einer zu vervielfältigenden Nukleinsäure-Sequenz und, fakultativ, eine markierte Sonde aufweist, die spezifisch für diese Sequenz ist.
- 30 22. Kartusche nach einem der Ansprüche 1 bis 21, wobei zumindest ein Teil der Reaktionskammern (13) Reagenzien enthalten, die dort durch Einbringen einer Flüssigkeit gefolgt von einer Trocknung eingebracht werden, derart, dass der Eintritt eines Fluids in die Reaktionskammern die Reagenzien wieder auflöst.
- 35 23. Vorrichtung zur Durchführung enzymatischer Reaktionen und/oder Molekularbiologie-Reaktionen, die zumindest zwei verschiedene Inkubationstemperaturen benötigen, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie umfasst:
 - zumindest eine Kartusche (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 22,
 - zumindest eine Heizplatte (2), die zumindest zwei unterschiedliche Zonen aufweist, die auf zumindest zwei verschiedene Temperaturen gebracht werden können,
 - Mittel (3) für die relative Bewegung zwischen der Kartusche und der Platte, um eine zyklische Veränderung der Temperatur der Reaktionskammern zu ermöglichen.
- 40 24. Vorrichtung nach Anspruch 23, wobei die enzymatische Reaktion eine temperaturabhängige Kettenreaktion von Nukleinsäure-Sequenzen ist und wobei die Zonen der Heizplatte (2) auf zumindest zwei verschiedene Temperaturen gebracht werden können, die den Phasen der Zyklen für die Vervielfältigung der Nukleinsäuren entsprechen.
- 45 25. Vorrichtung nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet, dass**
 - spezifische Initiatoren von zu vervielfältigenden Zielsequenzen in den Reaktionskammern (13) vorab verteilt sind,
 - der Behälter (11) für die Aufnahme eines Fluids vorgesehen ist, das insbesondere von einer zu analysierenden Nukleinsäure-Probe und Reagenzien gebildet ist, die für eine Polymerase-Kettenreaktion notwendig sind, mit Ausnahme der Initiatoren,
 - die Heizplatte (2) drei unterschiedliche Zonen aufweist, die auf drei verschiedene Temperaturen gebracht werden können, die den drei Phasen der Zyklen für die Polymerase-Kettenreaktion entsprechen.
- 50 26. Vorrichtung nach Anspruch 24 oder 25 für die temperaturabhängige Kettenreaktion von Nukleinsäure-Sequenzen, die in Echtzeit gemessen wird, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie optische Mittel (5) für die Anregung/Messung der Fluoreszenz enthält, die derart angeordnet sind, dass sie bei jedem Zyklus die Fluoreszenz des Inhalts der Reaktionskammern anregen und messen.
- 55

27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 bis 26, wobei die unterschiedlichen Heizzonen der Platte (2) als zumindest zwei oder drei Scheibenteile aufgeteilt sind.
- 5 28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 bis 27, wobei die Heizplatte (2) feststehend ist und die Kartusche (1) mit Hilfe der Bewegungsmittel (3) bewegt wird.
29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 bis 27, wobei die Kartusche (1) feststehend ist und die Heizplatte (2) mit Hilfe der Bewegungsmittel (3) bewegt wird.
- 10 30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 bis 29, wobei die Bewegungsmittel (3) es ermöglichen, die Kartusche (1) und/oder die Heizplatte (2) in eine Drehung zu versetzen.
31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 bis 30, wobei die Kartusche (1) in direktem Kontakt mit der Heizplatte (2) ist.
- 15 32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 bis 31, wobei die Platte (2) mit einer Beschichtung versehen ist, welche die relative Bewegung zwischen der Kartusche (1) und der Platte (2) begünstigt.
33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 bis 32, wobei die Heizplatte (2) zwei oder drei unterschiedliche Thermoblocks (21, 22 und gegebenenfalls 23) aufweist, die mit Mitteln zur Programmierung ihrer Temperatur verbunden sind.
- 20 34. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 bis 33, wobei die Kartusche (1) auf der Unterseite einen mittigen vorspringenden Teil (181) mit einer Nut (182) aufweist und die Bewegungsmittel (3) zumindest eine Nase (32) umfassen, die mit der Nut (182) zusammenwirkt, um die Kartusche (1) in eine Drehbewegung zu versetzen.
- 25 35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 bis 34, umfassend optische Mittel (5) für die Anregung/Messung der Fluoreszenz, die oberhalb oder seitlich zur Kartusche angeordnet sind.
36. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 bis 35, ferner Mittel (4) für die Zuführung des in dem Behälter (11) vorhandenen Fluids in die Reaktionskammern (13) umfassend.
- 30 37. Vorrichtung nach Anspruch 36, wobei die Zuführmittel (4) eine Kolben-Vorrichtung (41) umfassen und das Fluid in die Reaktionskammern durch eine Erhöhung des Drucks zugeführt wird.
38. Vorrichtung nach Anspruch 36, wobei die Zuführmittel (4) eine Pumpe (41) umfassen und das Fluid in die Reaktionskammern durch eine Wiederherstellung des Drucks nach einer Erzeugung eines Unterdrucks zugeführt wird.
- 35 39. Vorrichtung nach Anspruch 38, wobei die Reaktionskammern (13) der Kartusche (1) verschlossen sind.
- 40 40. Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäure mit Hilfe einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 bis 39, das die folgenden Schritte umfasst:
- 45 - zumindest teilweises Befüllen des Behälters (11) mit einem Fluid, das eine zu analysierende Nukleinsäure-Probe sowie all das für eine Kettenreaktion Notwendige mit Ausnahme der Initiatoren und, gegebenenfalls, eine fluoreszierende Anzeige der Nukleinsäuren enthält,
- Verteilen des Fluids in den Reaktionskammern (13) der Kartusche (1), in denen vorab Initiatoren und, gegebenenfalls, eine oder mehrere markierte Sonden angeordnet wurde,
- Einsetzen der Mittel (3) für die relative Bewegung zwischen der Kartusche und der Heizplatte, um nacheinander und so oft wie gewünscht den Inhalt jeder Reaktionskammer auf zwei, drei oder mehr Temperaturen zu bringen, die durch die zwei, drei oder mehr Zonen der Heizplatte (2) festgelegt werden.
- 50 41. Vervielfältigungsverfahren nach Anspruch 40, wobei der Schritt der Verteilung des Fluids in den Reaktionskammern (13) durchgeführt wird, indem ein Unterdruck im Innern der Kartusche erzeugt wird und anschließend der Druck wiederhergestellt wird.
- 55 42. Verfahren zur Befüllung der Reaktionskammern (13) einer Kartusche (1) im geschlossenen System nach Anspruch 17, das die folgenden Schritte aufweist:
- zumindest teilweises Befüllen des Behälters (11) mit einem Fluid,

EP 1 305 115 B1

- Anschließen der Kartusche an die Mittel (4) zur Modulierung des Drucks,
- Erzeugen eines Unterdrucks im Innern der Kartusche und anschließend Wiederherstellen des Drucks.

5

10

15

20

25

30

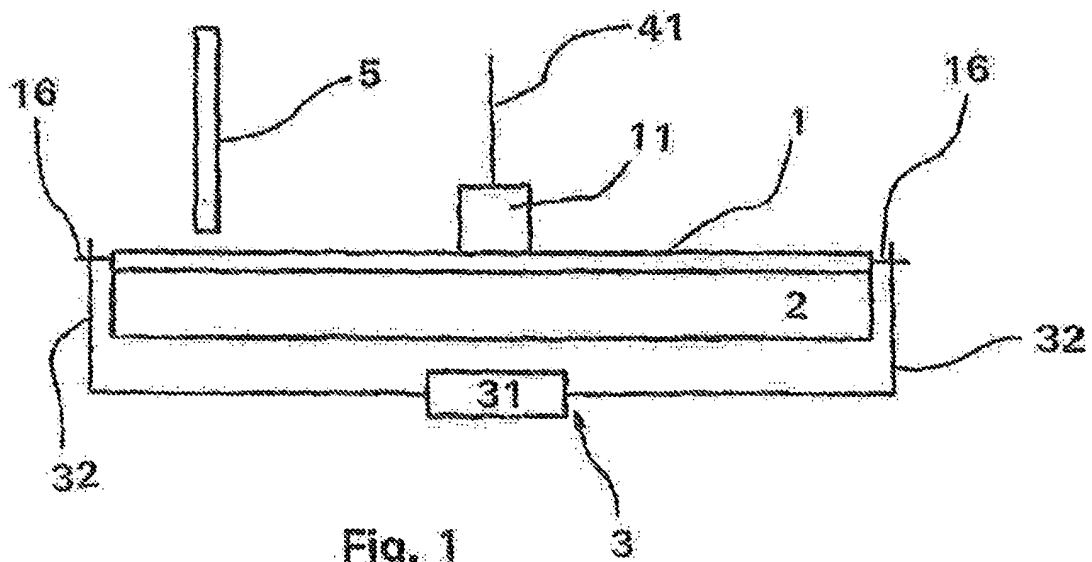
35

40

45

50

55



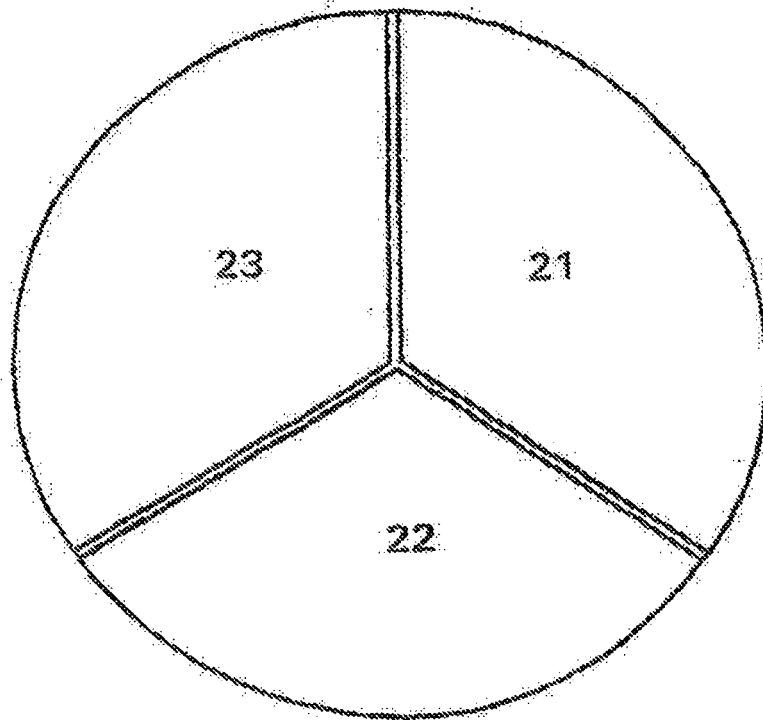


Fig. 2 A

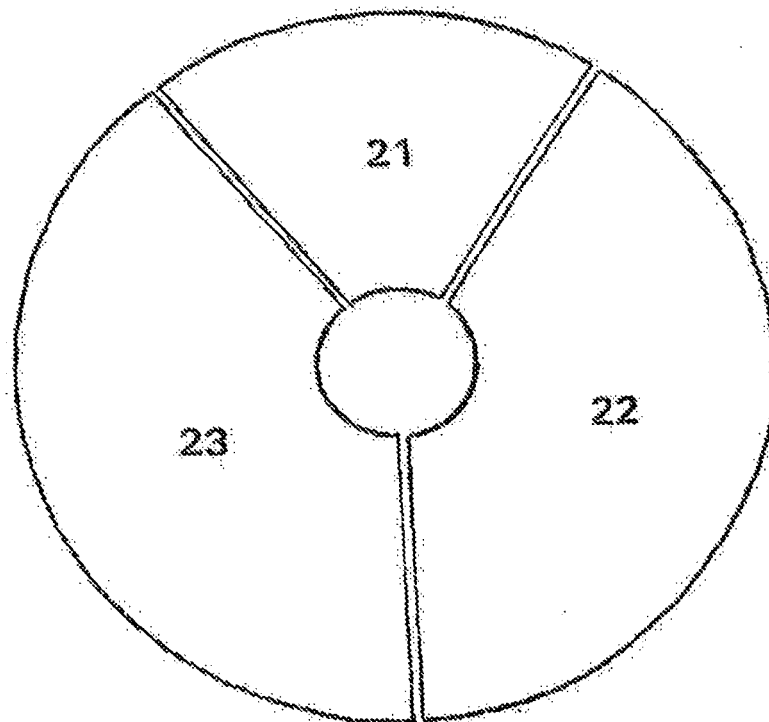


Fig. 2 B

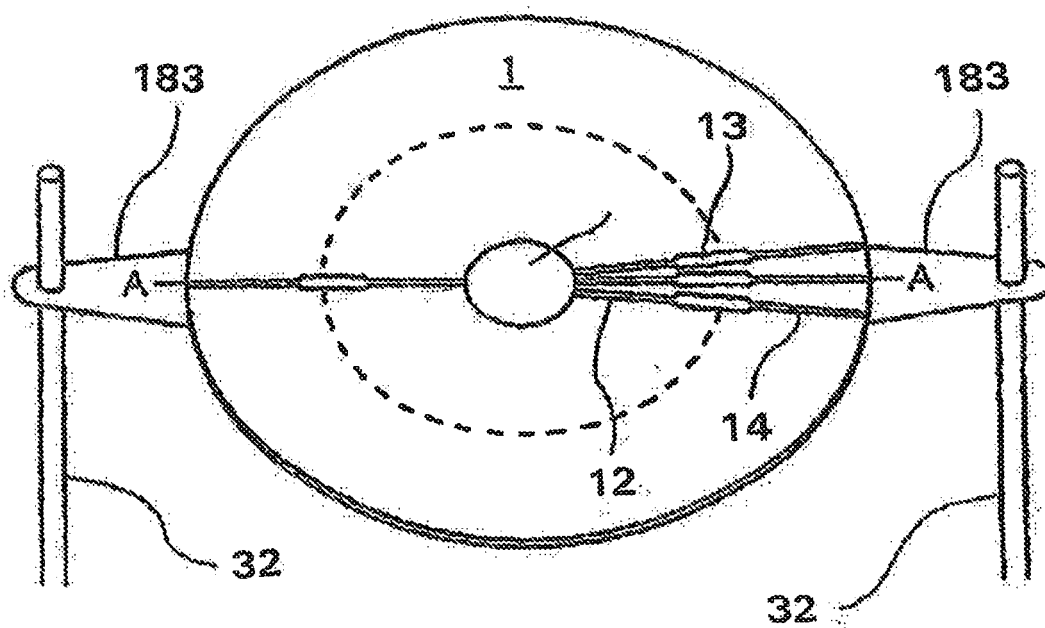


Fig. 3

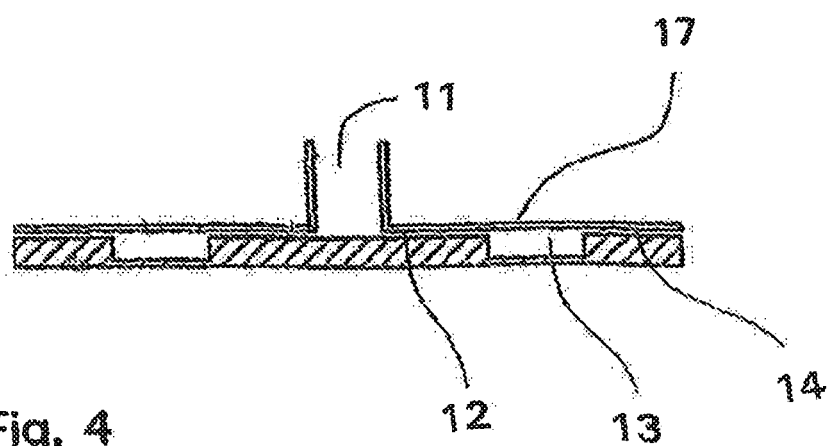


Fig. 4

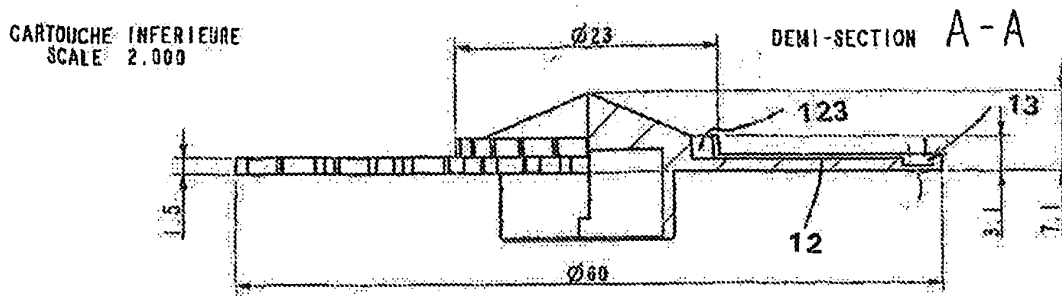


Fig. 6

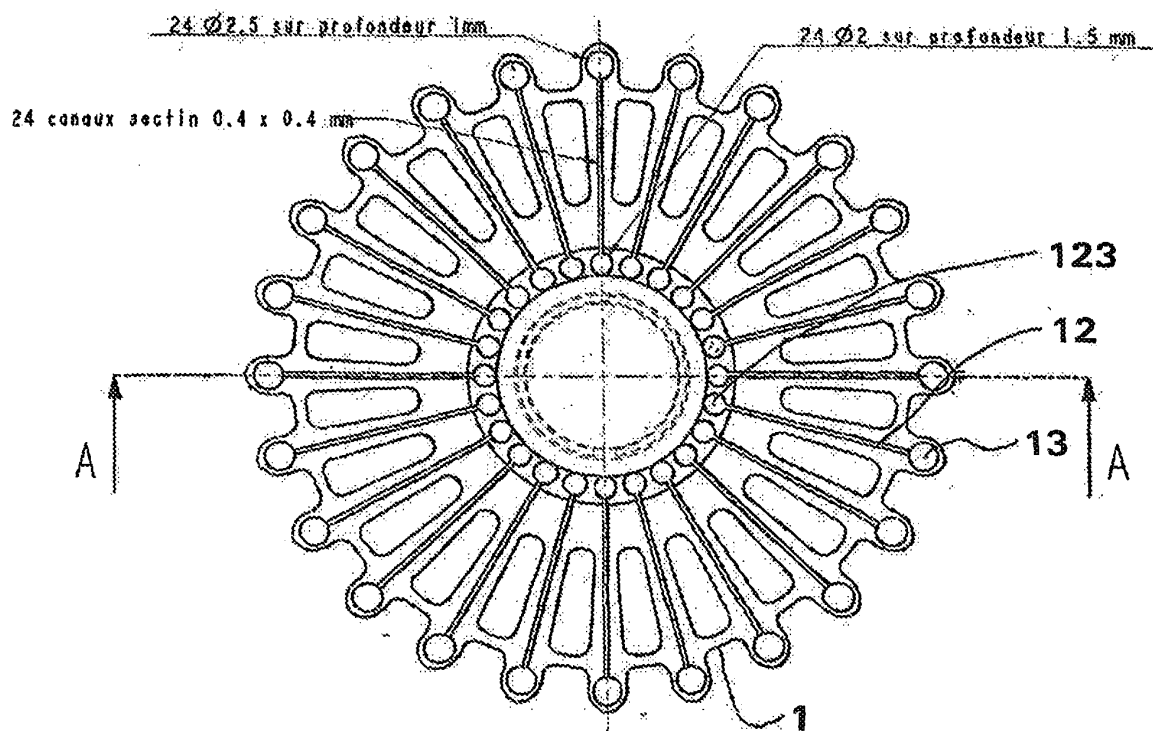
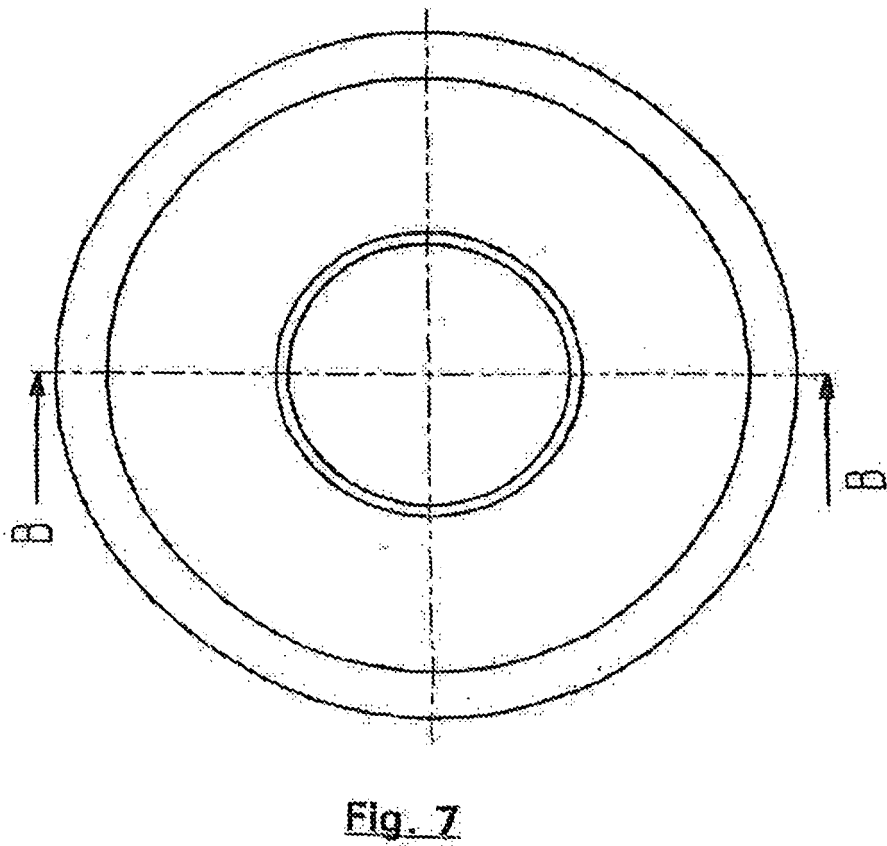
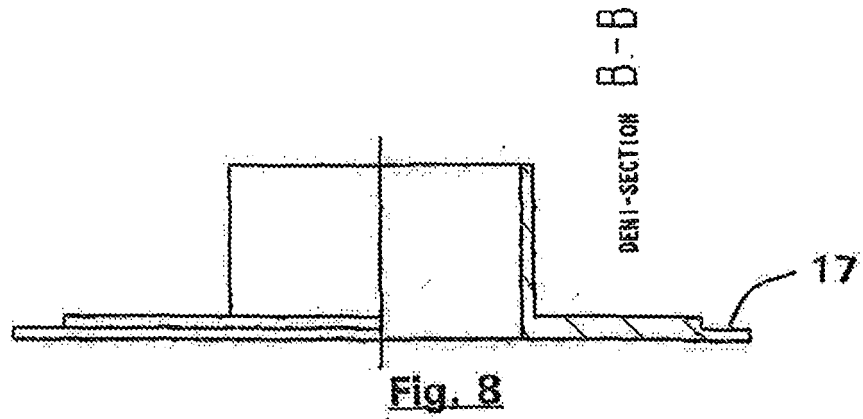


Fig. 5



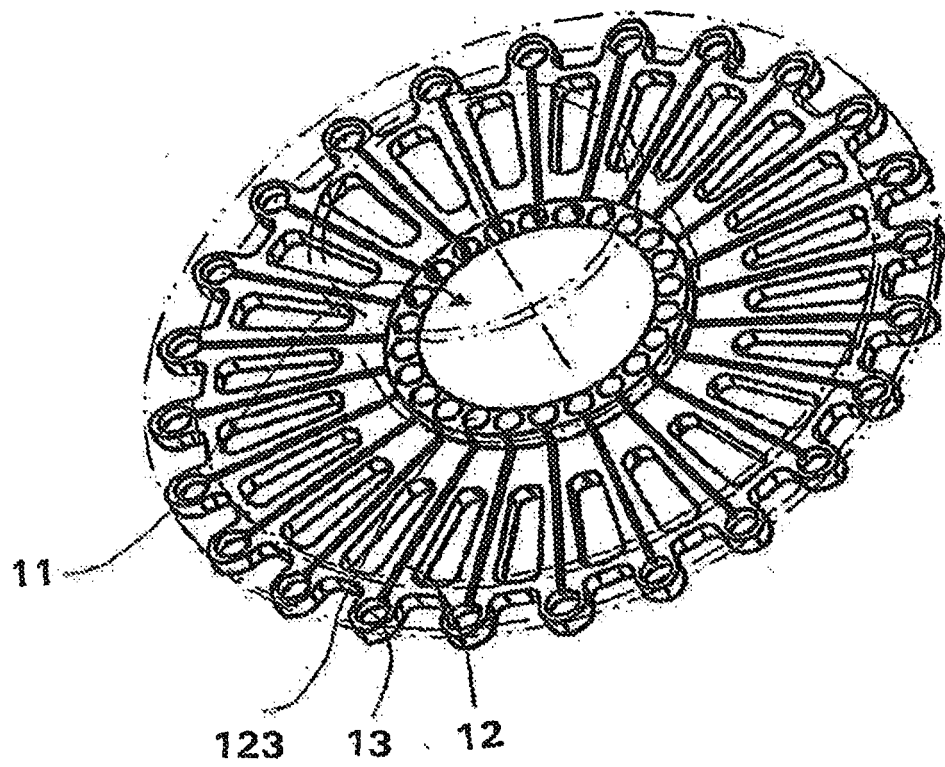


Fig. 9

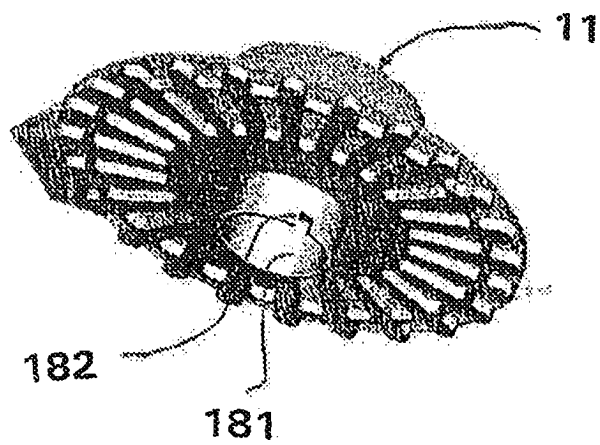
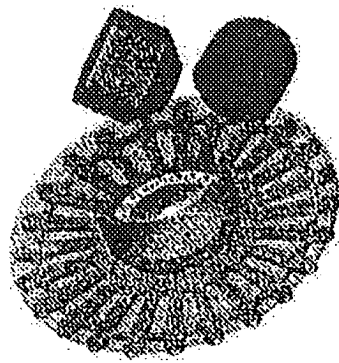
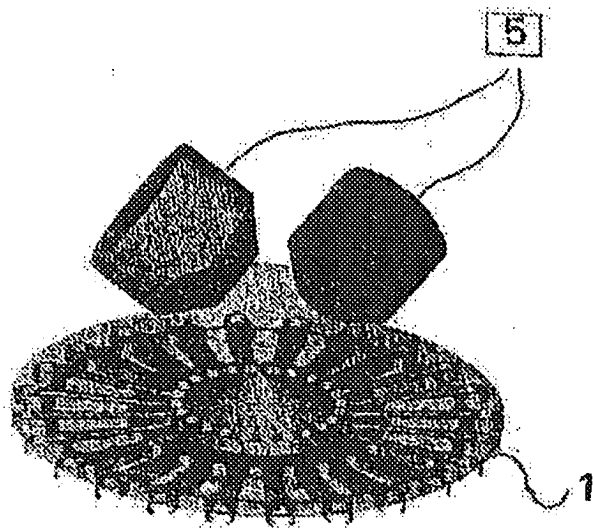


Fig. 10

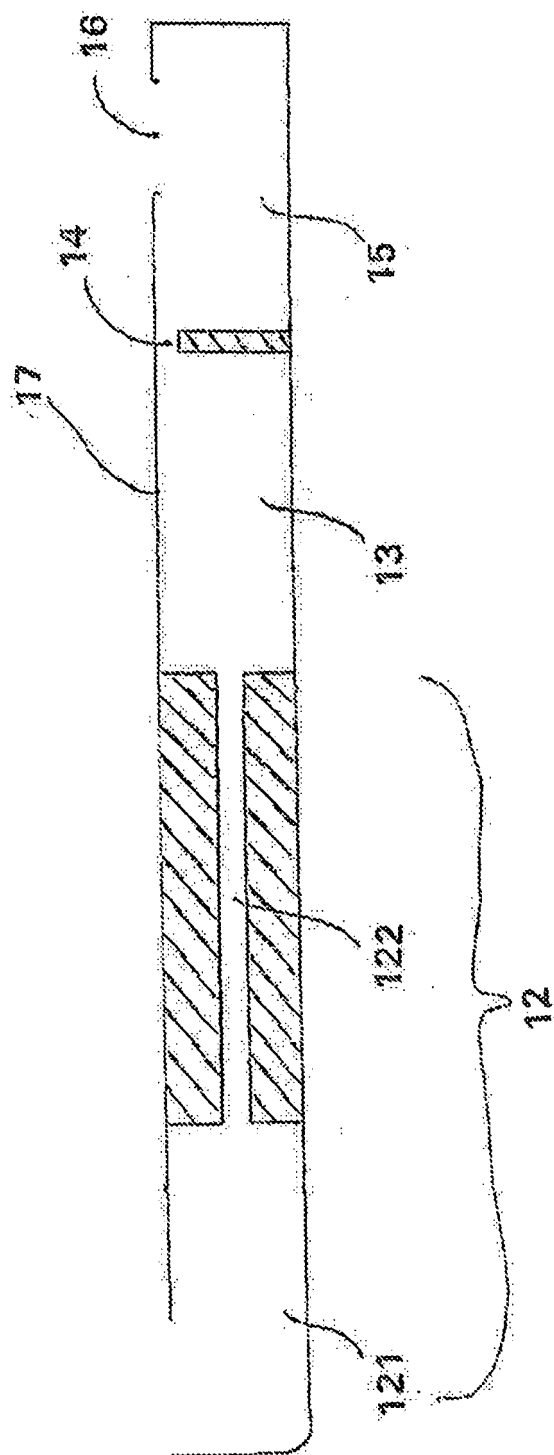


Fig. 11

RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

Cette liste de références citées par le demandeur vise uniquement à aider le lecteur et ne fait pas partie du document de brevet européen. Même si le plus grand soin a été accordé à sa conception, des erreurs ou des omissions ne peuvent être exclues et l'OEB décline toute responsabilité à cet égard.

Documents brevets cités dans la description

- DE 19852835 A [0054]