

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 955 668

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

②① N° d'enregistrement national :

10 00340

⑤① Int Cl⁸ : **G 01 N 31/22** (2006.01), **G 01 N 33/18**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 28.01.10.

③③ Priorité :

⑦① Demandeur(s) : UNIVERSITE DE PROVENCE AIX
MARSEILLE 1 — FR.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 29.07.11 Bulletin 11/30.

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

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦② Inventeur(s) : BOUDENNE JEAN LUC, COULOMB
BRUNO, ROBERT PEILLARD FABIEN et BARCO
PALACIO EDWIN.

⑦③ Titulaire(s) : UNIVERSITE DE PROVENCE AIX MAR-
SEILLE 1.

⑦④ Mandataire(s) : SANTARELLI.

⑤④ KIT DE DETECTION DE GROUPEMENTS FONCTIONNELS CARBOXYLIQUES.

⑤⑦ L'invention a pour objet un kit pour l'identification, la
caractérisation et la quantification par détection unique des
groupements fonctionnels carboxyliques, thiols et amines
contenus dans un échantillon.

FR 2 955 668 - A1



Kit de détection de groupements fonctionnels carboxyliques.

L'invention se place dans le domaine de la surveillance de la qualité de l'environnement, en particulier dans l'étude de la qualité des sols, et plus particulièrement encore dans la gestion des déchets et des eaux usées, notamment au sein d'unités de traitement de boues par procédés anaérobies (méthanisation par exemple), dans le cadre de l'exploitation des stations d'épuration biologiques, ainsi qu'au niveau des effluents et eaux de l'industrie agro-alimentaire, ou encore de décharges, mais également dans le domaine de la santé.

L'invention concerne un kit pour l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels carboxyliques, thiols et amines contenus dans un échantillon, ainsi que l'utilisation dudit kit pour identifier, caractériser et quantifier par détection unique les groupements fonctionnels carboxyliques, thiols et amines contenus dans un échantillon.

L'identification de la nature des composés organiques dissous (généralement regroupés sous le terme intégratif de Carbone Organique Dissous, COD) est limitée à une semi-spéciation permettant de déterminer la teneur en composés hydrophiles et hydrophobes (séparation sur résines macroporeuses par filtration de gel puis par ultrafiltration), à estimer un indice d'humification ou, dans le meilleur des cas, en différentes fractions réalisées par extractions séquentielles sur résines ioniques ou non ioniques permettant de définir des teneurs en composés plus ou moins biodisponibles suivant les extractants utilisés.

En aval de ces étapes d'extraction, une caractérisation des groupements fonctionnels est parfois réalisée par analyse spectrale dans le domaine du proche infrarouge (PIR), par Résonance Magnétique Nucléaire du carbone (RMN-C¹³) ou par Pyrolyse couplée à la Chromatographie en phase Gazeuse et détection par Spectrométrie de Masse (Pyr-CG-SM.).

La fonction carboxylique peut être estimée par la quantification séparée des acides aliphatiques à chaîne carbonée courte (acides formique, lactique, pyruvique, propionique, succinique, glycérique et citrique) par chromatographie ionique ou chromatographie liquide généralement couplée à un détecteur conductimétrique ou spectrophotométrique UV-visible. La chromatographie liquide (HPLC) peut également être couplée à des détecteurs de spectrométrie de masse (LC/MS). La chromatographie en phase gazeuse (GC) a également été appliquée, couplée à des détecteurs à ionisation de flamme ou à des spectromètres de masse, les acides carboxyliques étant quantifiés après une étape de dérivation et une étape d'extraction liquide-liquide ou

solide-liquide. On peut également citer des couplages plus complexes de type GC/EI-MS (Spectrométrie de masse à impact d'électron), CG/CI-MS (spectrométrie de masse avec ionisation chimique) avec quantification après micro-extraction en phase solide.

Plus récemment, les acides carboxyliques ont été analysés par électrophorèse capillaire (CE). Certaines de ces méthodes peuvent présenter des interférences sérieuses avec des cations métalliques di ou trivalents, qui peuvent être réduites par l'ajout d'EDTA avant analyse. Souza et collaborateurs (S.R. Souza et al. *Journal of Chromatography A* 796, 335-346, 1998) ont comparé l'analyse de 7 acides carboxyliques principaux par chromatographie ionique (IC) et électrophorèse capillaire couplées à un détecteur UV et ont conclu que le choix de la méthode analytique dépendait du type d'échantillon analysé, la méthode IC présentant l'inconvénient de mal séparer les différents acides, la méthode CE manquant quant à elle de sensibilité.

Pour améliorer les caractéristiques analytiques de ces méthodes chromatographiques, de nombreux travaux se sont orientés vers la dérivation des acides carboxyliques, afin de former un sous-produit présentant par exemple une fluorescence très intense et permettant une quantification très sensible. Pour atteindre des rendements de dérivation suffisants, il est préalablement nécessaire de procéder à l'activation du groupement carboxylique, à l'aide de réactifs tels que carbodiimides, sels de pyridinium ou disulfites. Pour la dérivation, de nombreux composés fluorescents peuvent être utilisés. Les plus courants sont les bromoalkyles, les diazométhanes, les hydrazines, et les amines.

La fonction thiol est contenue dans de nombreux composés soufrés d'importance biologique ou écologique, tels que glutathion, phytochélatines, cystéine. Ces composés sont très souvent produits par des plantes ou du phytoplancton suite à un stress induit par la présence de micropolluants métalliques et/ou organiques. Kawakami et collaborateurs (S.K. Kawakami et al. *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 2, 133-142, 2006) ont effectué une revue des principales méthodes de détection des thiols dans différentes matrices biologiques ou environnementales. Les thiols peuvent être dosés directement par différentes méthodes électrochimiques : polarographie, voltamétrie ou bien ampérométrie. Ces méthodes présentent cependant des inconvénients de sélectivité et d'interférences de matrices. Plus classiquement, les thiols sont généralement dosés indirectement après dérivation et séparation par chromatographie liquide ou électrophorèse capillaire avec détection par spectrométrie UV visible ou spectrométrie de masse. Lock et Davis (J. Lock, J. Davis *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 12, 807-815, 2002) ont publié une revue des différents agents de dérivation principalement utilisés pour le dosage des thiols : haloacétamide, maleimides,

benzoxadizoles, isoindoles.

Le dosage de la fonction amine est généralement effectué par séparation des composés aminés par chromatographie liquide ou électrophorèse capillaire après dérivation. A. Önal (A. Önal *Food Chemistry* 103, 1475-1486, 2007) a récemment publié
5 une revue bibliographique détaillant les différentes méthodes de dosages des amines d'intérêt biologique. On peut y relever que la dérivation des amines est principalement réalisée par 4 composés : o-phthalaldéhyde (OPA), Chlorure de 5-diméthylaminonaphtalène-1-sulfonyl (DNS), 4-chloro-7-nitrobenzofurane ou 1,2-naphtoquinone-4-sulfonate (NQS). La détection est assurée par un détecteur UV-visible
10 ou fluorimétrique. Il n'existe que quelques méthodes dans lesquelles l'étape de dérivation préalable n'est pas utilisée, la séparation étant assurée par chromatographie liquide ou électrophorèse capillaire, et la détection par conductimétrie, enzymologie ou ampérométrie. La méthode la plus utilisée reste cependant la séparation des dérivés de l'OPA. L'OPA réagit avec les amines primaires en présence d'un composé thiol, en
15 milieu tamponné par le borate. Des recherches récentes ont été menées afin de déterminer quel composé thiol donne des dérivés stables, ou bien encore pour synthétiser des réactifs réagissant avec les amines et formant des dérivés plus absorbants ou plus fluorescents. Cependant, nombre de ces composés nouvellement synthétisés ne sont pas commerciaux.

20 On constate donc que la plupart des méthodes de quantification des composés carboxyliques, thiols ou amines passent par une étape de séparation chromatographique ou électrophorétique. Ceci induit des temps d'analyse relativement long (10 à 30 minutes suivant les méthodes). D'autre part, ces méthodes utilisent un matériel assez complexe d'utilisation et ne pouvant être mis en œuvre qu'en laboratoire.

25 Il existe donc un besoin en méthodes d'identification, de caractérisation et de quantification par détection unique des groupements fonctionnels carboxyliques, thiols et amines contenus dans un échantillon simples, rapides, peu coûteuses et surtout utilisables sur le terrain sans avoir besoin de mettre en œuvre des équipements lourds et coûteux.

30 C'est un des buts de l'invention.

Ainsi l'invention a pour objet un kit pour l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels carboxyliques, thiols et amines contenus dans un échantillon, comprenant

- 35 a. au moins un agent activateur primaire des carbones porteurs des groupements fonctionnels carboxyliques ;
- b. au moins une amine primaire fluorescente,

- c. au moins un composé de la famille des dialdéhydes ;
- d. au moins une amine non fluorescente ;
- e. au moins un tampon modulateur de pH ;
- f. au moins un thiol non fluorescent.

5 Le kit selon l'invention ne nécessite qu'un investissement raisonnable au niveau de l'appareillage pour sa mise en œuvre qui est simple et facilement réalisable sur site.

La mise en œuvre dudit kit, bien que ne permettant pas une quantification séparée de tous les composés carboxyliques, amines ou thiols contenus dans l'échantillon, permet la quantification globale des groupements fonctionnels visés
10 (concentration totale en thiols et concentration totale en amines, concentration totale en acides carboxyliques aliphatiques : Acides Gras Volatils = AGV) et donne en quelques minutes une indication fiable sur la qualité d'une eau, d'un sol ou d'un déchet, ou bien encore l'état de fonctionnement d'un procédé de traitement.

Selon l'invention, l'agent activateur primaire des carbones porteurs des groupements fonctionnels carboxyliques peut être choisi parmi les carbodiimides, comme par exemple le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) ou le *N*-Cyclohexyl-*N'*-(2-morpholinoethyl)carbodiimide méthyl-*p*-toluènesulfonate (CMC), ou encore le *N*, *N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), le *N,N'*-Diisopropylcarbodiimide (DIC), le Bis(triméthylsilyl)carbodiimide (BTSC), et préférentiellement de l'EDC ou du CMC,
20 très préférentiellement de l'EDC.

Selon une variante de l'invention, le kit peut comprendre en outre au moins un agent activateur secondaire, activateur des carbodiimides, eux-mêmes activateurs des carbones porteurs des groupements fonctionnels carboxyliques, qui peuvent être choisis parmi la *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ou du 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) ou
25 du tétrafluorophénol (TTP) ou du 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAT), préférentiellement de l'HOAT.

Selon l'invention, l'amine primaire fluorescente peut être un composé de la famille des benzofurazanes, ou de la famille des aminophénanthrènes, ou de la famille des coumarines, ou de la famille des dérivés "dansyles", du *N*-1-éthylènediaminonaphthalène (EDAN), ou de la 5-aminofluorescéine (5-AF), ou de la monodansylcadavérine (MDC) ou du chlorure de bleu du Nil (NBCI), préférentiellement de l'EDAN.
30

Selon une autre variante de l'invention, le kit peut comprendre en outre un solvant d'extraction de l'amine primaire fluorescente, qui peut être un solvant organique, non miscible à l'eau, comme par exemple du méthyl-tertiobutyl éther
35

(MTBE), du dibutyl éther (DBE), de l'acétate d'éthyle, du cyclohexane ou encore du dichlorométhane, préférentiellement du MTBE.

Selon l'invention le composé de la famille des dialdéhydes peut par exemple être de l'o-phthaldialdéhyde (OPA) ou du naphthalène-2,3-dicarboxyaldéhyde (NDA),
5 préférentiellement de l'OPA.

Toujours selon l'invention, l'amine non fluorescente peut être du 2-aminoéthanol, de la glycine, de la valine, de la leucine, de la butylamine, de la tert-butylamine ou bien encore de la N-ε-acétyl-L-lysine, préférentiellement du 2-aminoéthanol.

Selon encore l'invention, le modulateur de pH peut être un tampon borate, un
10 tampon phosphate, un tampon citrate, un tampon organique comme l'HEPES (acide 1-Piperazineethane sulfonique) ou encore un tampon TRIS (tris(hydroxyméthyl)aminoéthane), préférentiellement un tampon borate pour la détermination des thiols et des amines et un tampon phosphate pour la détermination des acides carboxyliques.

15 Toujours selon l'invention, le thiol non fluorescent peut être choisi parmi de nombreux composés thiols tels que le glutathion, l'acide mercaptoacétique (ou thioglycolique), la cystéine, l'acide mercaptoéthanesulfonique, le 2-mercaptoéthanol, l'acide 3-mercaptopropionique, l'acide 2-mercaptopropionique, l'acide mercaptosuccinique, de la N-acétyl-cystéine (NAC), le méthanethiol, le
20 monothioglycérol, des sels de sulfites ou encore des sels de thiosulfates, préférentiellement le mercaptoéthanol.

Selon une autre variante de l'invention, le kit peut en outre comprendre au moins un agent réducteur, pouvant être avantageusement choisi parmi les composés de la famille des hydrazines, des hydrures, des thiols comme par exemple le dithioérythritol
25 (DTE) ou le dithiothritol (DDT), ou des trialkylphosphines dont la tri-n-butylphosphine (TBP) ou encore de l'hydrochlorure de tris-2-carboxyéthyl-phosphine (TCEP), préférentiellement de l'hydrochlorure de tris-2-carboxyéthyl-phosphine.

Selon une autre variante de l'invention, le kit peut en outre comprendre un tampon de dissolution de l'échantillon à tester, ledit tampon ayant un pH pouvant être
30 compris entre 3,5 et 5,5, préférentiellement entre 4,0 et 5,0, très préférentiellement 4,5.

Selon une autre variante de l'invention, le kit peut en outre comprendre un acide comme par exemple de l'acide chlorhydrique (HCl).

Selon encore une autre variante de l'invention, le kit peut en outre comprendre une base inorganique, comme de la soude (NaOH).

35 Selon encore une autre variante de l'invention, le kit peut en outre comprendre un activateur de fluorescence comme un tensioactif (ou surfactant) ou un composé de

la famille des cyclodextrines, préférentiellement un tensioactif, à une concentration comprise entre 100 et 120% de sa CMC (Concentration Micellaire Critique), et très préférentiellement 100% de la CMC.

5 Selon une autre variante de l'invention, le kit peut également comprendre un agent actif halogéné, qui peut être de l'hypochlorite de sodium, de la N-chlorosuccinimide ou bien encore un composé de la famille des chloramines.

10 Le kit selon l'invention peut se présenter sous toutes les formes souhaitées compatibles avec une commercialisation. Avantageusement il pourra se présenter sous la forme d'une plaque multialvéolaire, chaque alvéole comprenant une quantité suffisante de chacun des éléments nécessaires à l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels carboxyliques, thiols et amines contenus dans un échantillon tels que décrits précédemment. Selon cette variante, chaque alvéole peut contenir les éléments nécessaires à l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels carboxyliques, thiols et amines contenus dans un échantillon en quantité suffisante pour une analyse. Selon encore cette variante les éléments nécessaires pour l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels carboxyliques, thiols et amines contenus dans un échantillon peuvent être sous forme liquide et alors la plaque pourra être munie de moyen de
20 fermeture des alvéoles, ou encore sous forme lyophilisée.

Le kit selon l'invention peut également être intégré dans un analyseur en ligne.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'un kit tel que décrit précédemment, pour l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels carboxyliques, thiols et amines contenus dans un
25 échantillon.

Selon l'invention, le kit pour l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels carboxyliques est simple, la solubilité des différents constituants et la réactivité des réactifs du kit sont améliorées. De plus, le volume d'échantillon nécessaire à la réaction est diminué et les
30 interférences sont limitées.

Ce kit peut être mis en œuvre dans un procédé pour l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels carboxyliques (par ailleurs dans le texte dénommé procédé de détermination des groupements carboxyliques) dans lequel

35 a. Dans une première étape on mélange un échantillon à analyser préalablement prélevé, avec une solution de dissolution dudit échantillon à

tester préalablement préparée par mélange d'au moins un tampon, un agent activateur primaire des carbones porteurs des groupements fonctionnels carboxyliques et un agent activateur secondaire, et on incube ce mélange pendant un temps compris entre 2 et 8 minutes, préférentiellement entre 4 et 6 minutes ;

5

b. dans une seconde étape on ajoute au mélange obtenu à la première étape une amine primaire fluorescente dissoute dans de l'eau ultrapure ou dans un tampon ;

10

c. dans une troisième étape on ajoute au mélange obtenu à la seconde étape, un composé choisi parmi les membres de la famille des dialdéhydes, comme la naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA) ou l'o-phthaldialdéhyde (OPA), préférentiellement l'OPA, préalablement dissout dans un tampon aqueux de pH basique (solution de borate, phosphate, hydroxyde de sodium...) à un pH compris entre 6 et 11, préférentiellement entre 8 et 9,5, très préférentiellement entre 8,5 et 9,5 ou dans un solvant mixte (solvant organique/eau), à un pH compris entre 5 et 9, préférentiellement 6,5, ou dans un solvant organique, préférentiellement dans un solvant organique.

15

d. dans une quatrième étape on mesure la fluorescence induite du mélange obtenu précédemment à une longueur d'onde comprise entre 390 et 490 nm, de préférence 442 nm, après excitation à une longueur d'onde comprise entre 300 à 350 nm, de préférence 335 nm,

20

e. dans une cinquième étape on reporte la valeur obtenue à la quatrième étape sur une courbe étalon préalablement établie dans les mêmes conditions.

25

Selon l'invention, à la première étape du procédé de détermination des groupements carboxyliques, le tampon de la solution de dissolution de l'échantillon à tester peut être un tampon phosphate à une concentration qui peut être comprise entre 2 mM et 60 mM, préférentiellement entre 5 mM et 20 mM, très préférentiellement 10 mM.

30

Toujours à la première étape dudit procédé, la solution de dissolution de l'échantillon à tester peut avoir un pH compris entre 2 et 6, préférentiellement entre 3.0 et 4.0, très préférentiellement 3.5.

35

Toujours à la première étape du procédé de détermination des groupements carboxyliques, l'agent activateur primaire des carbones porteurs des groupements fonctionnels carboxyliques peut être choisi parmi les composés de la famille des carbodiimides, avantageusement parmi le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) ou le N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoéthyl)carbodiimide méthyl-p--

toluène sulfonate (CMC), ou encore le N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), du N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC), le Bis(triméthylsilyl)carbodiimide (BTSC). Préférentiellement l'agent activateur primaire des carbones porteurs des groupements fonctionnels carboxyliques pourra être de l'EDC ou du CMC, très préférentiellement de l'EDC. Ledit agent activateur primaire peut être à une concentration de 0 et 100 mg par ml d'échantillon à analyser, préférentiellement de 25 à 50 mg et très préférentiellement 37,5 mg par ml d'échantillon à analyser, dissout dans un solvant organique miscible à l'eau. Dans le cas de l'EDC, celui-ci peut être préférentiellement dissout dans de l'éthanol.

Selon l'invention, toujours à ladite première étape, l'agent activateur secondaire de l'agent activateur primaire décrit précédemment, peut être choisi parmi la NHS (N-hydroxysuccinimide) ou la 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) ou le tétrafluorophénol (TTP) ou le 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAT), préférentiellement de l'HOAT. Ledit agent activateur secondaire peut être à une concentration comprise entre 0 et 50 mg par ml d'échantillon à analyser, préférentiellement entre 15 et 30 mg et très préférentiellement 25 mg par ml d'échantillon à analyser, dissout dans la solution de dissolution de l'échantillon décrite à la première étape.

Selon l'invention, à la seconde étape du procédé de détermination des groupements carboxyliques, l'amine primaire fluorescente peut être un composé de la famille des benzofurazanes, ou de la famille des aminophénanthrènes, ou de la famille des coumarines, ou de la famille des dérivés "dansyles", du N-1-éthylènediaminonaphthalène (EDAN), ou de la 5-aminofluorescéine (5-AF), ou de la monodansylcadaverine (MDC) ou du chlorure de bleu du Nil (NBCl), préférentiellement de l'EDAN. Ladite amine primaire fluorescente peut être à une concentration comprise entre 0 et 100 mg par ml d'échantillon à analyser, préférentiellement entre 25 et 50 mg par ml d'échantillon à analyser, très préférentiellement 37.5 mg par ml d'échantillon à analyser, avantageusement mélangé à l'échantillon liquide, à un pH compris entre 5.5 et 11.0, préférentiellement entre 8.0 et 9.0, très préférentiellement 8.7.

Selon l'invention, toujours à la seconde étape du procédé de détermination des groupements carboxyliques, le tampon de dissolution de l'amine primaire fluorescente peut être un tampon borate.

Selon l'invention, à la troisième étape du procédé de détermination des groupements carboxyliques, le NDA ou l'OPA est préférentiellement dissoute dans un solvant organique, très préférentiellement dans l'éthanol.

Toujours à cette troisième étape, le solvant organique constituant le solvant mixte (solvant organique/eau) est avantageusement choisi parmi tout solvant

organique miscible à l'eau, préférentiellement de l'éthanol. Les proportions entre le solvant organique et l'eau n'ont que peu d'importance, cependant avantageusement selon l'invention le solvant mixte (solvant organique/eau), est préférentiellement dans des proportions 75/25, très préférentiellement dans des proportions 50/50.

5 Selon l'invention, à la troisième étape du procédé de détermination des groupements carboxyliques, le dialdéhyde peut être à une concentration comprise entre 0 et 200mg par ml d'échantillon à analyser, préférentiellement entre 20 et 100 mg par ml d'échantillon à analyser, très préférentiellement 50 mg par ml d'échantillon à analyser.

10 Selon l'invention, toujours à la troisième étape, le pH du solvant mixte peut être ajusté avec une base organique ou inorganique, comme une solution de borate, de phosphate ou bien encore d'hydroxyde de sodium.

15 Selon l'invention, à la cinquième étape du procédé de détermination des groupements carboxyliques, l'acide carboxylique de référence pour établir ladite courbe étalon préalablement établie, peut être choisi parmi tout acide monocarboxylique, comme par exemple l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide butyrique, l'acide valérique, l'acide formique, l'acide lactique, l'acide p-hydroxybenzoïque, préférentiellement l'acide acétique.

20 Selon l'invention, le kit pour l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels thiols (par ailleurs procédé de détections des thiols) peut être mis en œuvre dans un procédé dans lequel

- a. dans une première étape on mélange un échantillon préalablement prélevé, avec un composé choisi parmi les membres de la famille des dialdéhydes, comme la naphthalène-2,3-dicarboxyaldéhyde (NDA) ou l'o-phthaldialdéhyde (OPA) et une amine non fluorescente, préférentiellement le 2-aminoéthanol, préalablement dissous dans un solvant mixte (solvant organique/eau), à pH compris entre 6 et 11, préférentiellement entre 8 et 9,5, très préférentiellement entre 8,5 et 9,5 ;
- b. dans une deuxième étape on mesure la fluorescence du mélange obtenu à la première étape après excitation à une longueur d'onde de 335 nm, et mesure à une longueur d'onde de 450 nm pour l'identification, la caractérisation et la quantification des groupements fonctionnels monothiols ;
- c. Dans une troisième étape on reporte les valeurs obtenues à la troisième étape sur des courbes étalons préalablement établies dans les mêmes conditions avec un composé porteur de groupements thiols de référence.

35 Selon l'invention, à la première étape du procédé de détection des thiols, le composé choisi parmi les membres de la famille des dialdéhydes, peut être le

naphtalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA) ou l'o-phthaldialdéhyde (OPA),
préférentiellement l'OPA.

De même à cette première étape, l'amine non fluorescente peut être du 2-
aminoéthanol, de la glycine, de la valine, de la leucine, de la butylamine, de la tert-
5 butylamine ou bien encore de la N-ε-acétyl-L-lysine, préférentiellement du 2-
aminoéthanol.

Toujours à cette première étape, le solvant organique constituant le solvant mixte
(solvant organique/eau) est avantageusement choisi parmi tout solvant organique
miscible à l'eau, préférentiellement du méthanol. Les proportions entre le solvant
10 organique et l'eau n'ont que peu d'importance, cependant avantageusement selon
l'invention le solvant mixte (solvant organique/eau), est préférentiellement dans des
proportions 75/25, très préférentiellement dans des proportions 40/60.

Selon une variante de l'invention, à la première étape du procédé de détection
des thiols on peut ajouter un agent réducteur choisi parmi les composés de la famille
15 des hydrazines, des hydrures, des thiols comme par exemple le dithioérythritol (DTE)
ou le dithiothritol (DDT), ou des trialkylphosphines dont la tri-n-butylphosphine (TBP)
ou encore de l'hydrochlorure de tris-2-carboxyéthyl-phosphine (TCEP),
préférentiellement la tri-n-butylphosphine, avantageusement dissoute dans tout solvant
organique miscible à l'eau, préférentiellement du méthanol ou la tris-2-carboxyethyl-
20 phosphine, avantageusement dissoute dans un tampon aqueux, et un solvant
organique non miscible à l'eau, préférentiellement du dichlorométhane, afin de réduire
les composés thiols oxydés en composés monothiols. Selon une variante de
l'invention, à cette première étape du procédé, on peut également ajouter de l'acide
éthylène-diamine-tetraacétique (EDTA) afin d'éviter la ré-oxydation des thiols réduits et
25 de limiter les interférences des éléments métalliques.

A la deuxième étape du procédé de détection des thiols, on mesure la
fluorescence de la phase aqueuse obtenue à la première étape après excitation à une
longueur d'onde de 335 nm, et mesure à une longueur d'onde de 450 nm pour
l'identification, la caractérisation et la quantification des groupements fonctionnels
30 thiols totaux.

Selon une variante de l'invention, à la deuxième étape du procédé de détection
des thiols, on peut ajouter un activateur de fluorescence comme un tensioactif (ou
surfactant) ou un composé de la famille des cyclodextrines, préférentiellement un
tensioactif, et très préférentiellement le BRIJ, à une concentration comprise entre 100
35 et 120% de sa CMC (Concentration Micellaire Critique), et très préférentiellement
100% de sa CMC.

Selon l'invention, à la troisième étape du procédé de détection des thiols, le composé porteur de groupements thiols de référence peut être choisi parmi l'acide mercaptoacétique (ou thioglycolique), la cystéine, l'acide mercaptoéthanesulfonique, le 2-mercaptoéthanol, l'acide 3-mercaptopropionique, le glutathion, l'acide 2-mercaptopropionique, l'acide mercaptosuccinique, le méthane-thiol, la monothioglycér-
5 ol, préférentiellement le glutathion ou la cystéine, et très préférentiellement la cystéine.

Selon l'invention, le kit pour l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels amines (par ailleurs procédé de détection des amines) peut être mis en œuvre dans un procédé dans lequel :

- 10 a. dans une première étape on mélange un échantillon préalablement prélevé, avec un composé choisi parmi les membres de la famille des dialdéhydes et un composé thiol non fluorescent tel que le mercaptoéthanol, la N-acétyl-cystéine (NAC), ou encore l'acide 3-mercaptopropionique, ledit composé thiol étant préalablement dissous en solution à pH compris entre 6 et 11,
15 préférentiellement entre 9 et 10,5, dans un solvant aqueux ou dans un solvant mixte solvant organique/eau ;
- b. dans une deuxième étape, on mesure la fluorescence du mélange obtenu à la première étape après excitation à une longueur d'onde comprise entre 330 et 340 nm, et on mesure à une longueur d'onde comprise entre 430 et 460 nm
20 pour l'identification, la caractérisation et la quantification des groupements fonctionnels amines ;
- c. dans une troisième étape, on reporte les valeurs obtenues à la deuxième étape sur des courbes étalons préalablement établies dans les mêmes conditions avec un composé porteur de groupements amines de référence.

25 Selon l'invention, à la première étape du procédé de détection des amines, le composé choisi parmi les membres de la famille des dialdéhydes peut être le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA) ou l'o-phthaldialdéhyde (OPA), préférentiellement l'OPA.

Toujours à cette première étape le composé thiol non fluorescent peut être choisi
30 parmi de nombreux composés thiols tels que le mercaptoéthanol, la N-acétyl-cystéine (NAC), ou encore l'acide 3-mercaptopropionique, préférentiellement le 2-mercaptoéthanol.

Toujours à cette première étape, le solvant mixte solvant organique/eau est avantageusement constitué d'un solvant organique totalement miscible à l'eau,
35 préférentiellement du méthanol.

Selon l'invention, à la troisième étape du procédé de détection des amines, le composé porteur de groupements amines de référence peut être choisi parmi des amines primaires, des amines secondaires, des amines tertiaires ou des acides aminés, préférentiellement l'aminoéthanol, la glycine ou la butylamine et très préférentiellement la glycine.

Selon une variante de l'invention, à la première étape du procédé de détection des amines, on peut ajouter un agent actif halogéné, qui peut être de l'hypochlorite de sodium, de la N-chlorosuccinimide ou bien encore un composé de la famille des chloramines, préférentiellement de l'hypochlorite de sodium, afin de transformer les amines secondaires et tertiaires en amines primaires.

Selon l'invention, la mesure de la fluorescence qui intervient en fin de procédure d'analyse peut être réalisée sur tout spectrophotomètre à fluorescence, particulièrement sur un lecteur de microplaques tels ceux de marque PERKIN ELMER ou TECAN.

Selon l'invention, l'échantillon peut être un échantillon de déchets ou d'eaux usées ou de sols, ou de boues issues d'une unité de traitement de boues par méthanisation, avantageusement dans les procédés anaérobies, un échantillon issu de l'exploitation des stations d'épuration biologiques, ou encore un échantillon issu du domaine de la santé (fluides biologiques tels que des urines, du sang, des échantillons salivaires, de la sueur, ...).

On comprend bien entendu que l'un des intérêts du kit selon l'invention est qu'il permet de réaliser dans le même temps l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique (fluorescence sur microplaque) des groupements fonctionnels carboxyliques, thiols et amines contenus dans un échantillon.

La Figure 1 présente une courbe de calibration établie avec de l'acide acétique à des concentrations comprises entre 25 et 2500 mg/L. La figure présente l'intensité de la fluorescence mesurée à 396 nm après excitation à 335 nm en fonction de la concentration en acide acétique.

La Figure 2 présente la parfaite corrélation entre les mesures réalisées à l'aide du kit selon l'invention et les mesures réalisées selon la méthode standard (détermination de ces acides carboxyliques par chromatographie ionique avec détection par conductimétrie).

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront mieux des exemples qui suivent, donnés à titre illustratif et non limitatif.

Exemple 1

Dans un puits d'une microplaque 96 puits noire en polypropylène on introduit 150 μ L d'une solution d'HOAT à 2 mg/mL dissout dans du tampon phosphate 10 mM. Le pH

de cette solution a été ajusté à un pH de 3,5. On ajoute ensuite 8 µL d'un échantillon de boues de station d'épuration centrifugé et filtré sur filtre à fibre de verre 0,8 µm. Le pH de cet échantillon a été ajusté à un pH compris entre 3,5 et 5,5. A cette solution sont ajoutés 18 µL d'une solution d'EDC à 3 mg/180 µL d'éthanol.

- 5 Après agitation et incubation à 40 °C pendant 4 minutes, on ajoute 50 µL d'une solution d'EDAN à 3 mg/500 µL tampon borate 50 mM pH 8.7. Le mélange est agité et incubé à 40 °C pendant 2 minutes.

- On ajoute alors au mélange précédemment obtenu 18 µL d'une solution d'OPA à 4 mg/180 µL d'éthanol. Le mélange est agité et incubé à 40 °C pendant 12 minutes, et
10 on mesure la fluorescence grâce à un lecteur de fluorescence de microplaques à une longueur d'onde d'excitation de 335 nm et une longueur d'onde d'émission de 442 nm.

- Parallèlement, une courbe de référence est réalisée dans les mêmes conditions que celles auxquelles l'échantillon a été soumis avec de l'acide acétique à des concentrations comprises entre 25 et 2500 mg/L. Cette courbe étalon est présentée à
15 la figure 1. La valeur de l'intensité de fluorescence de l'échantillon est ensuite reportée sur la courbe étalon (Figure 1) ; il est alors possible d'exprimer le résultat de cette analyse en équivalent acide acétique et donc de déterminer le nombre d'équivalent acide acétique dans l'échantillon

REVENDECATIONS

- 1.) Procédé pour l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels carboxyliques, dans lequel
- 5 a. dans une première étape on mélange un échantillon à analyser préalablement prélevé, avec une solution de dissolution dudit échantillon à tester préalablement préparée par mélange d'au moins un tampon, un agent activateur primaire des carbones porteurs des groupements fonctionnels carboxyliques et un agent activateur secondaire, et on incube ce mélange
- 10 pendant un temps donné ;
- b. dans une seconde étape on ajoute au mélange obtenu à la première étape une amine primaire fluorescente dissoute dans de l'eau ultrapure ou dans un tampon ;
- c. dans une troisième étape on ajoute au mélange obtenu à la seconde étape,
- 15 un composé choisi parmi les membres de la famille des dialdéhydes, préalablement dissout dans un tampon aqueux de pH basique ou dans un solvant organique, ou dans un solvant mixte (solvant organique/eau).
- d. dans une quatrième étape on mesure la fluorescence induite du mélange obtenu précédemment à une longueur d'onde comprise entre 390 et 490 nm,
- 20 de préférence 442 nm, après excitation à une longueur d'onde comprise entre 300 à 350 nm, de préférence 335 nm.
- e. dans une cinquième étape on reporte la valeur obtenue à la quatrième étape sur une courbe étalon préalablement établie dans les mêmes conditions.
- 2.) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'à la première étape le
- 25 tampon de la solution de dissolution de l'échantillon à tester est un tampon phosphate à une concentration comprise entre 2 mM et 60 mM, préférentiellement entre 5 mM et 20 mM, très préférentiellement 10 mM.
- 3.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que à la première étape la solution de dissolution de l'échantillon à tester a un
- 30 pH compris entre 2 et 6, préférentiellement entre 3,0 et 4,0, très préférentiellement 3.5.
- 4.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que à la première étape l'agent activateur primaire des carbones porteurs des groupements fonctionnels carboxyliques est choisi parmi les composés de la
- 35 famille des carbodiimides, avantageusement parmi le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) ou le N-cyclohexyl-N'-(2-

morpholinoéthyl)carbodiimide méthyl-p-toluène sulfonate (CMC), ou encore le N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), du N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC), le Bis(triméthylsilyl)carbodiimide (BTSC), préférentiellement de l'EDC ou du CMC, très préférentiellement de l'EDC.

- 5 5.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'à ladite première étape, l'agent activateur primaire est à une concentration comprise entre 0 et 100 mg par ml d'échantillon à analyser, préférentiellement entre 25 et 50 mg par ml d'échantillon à analyser, très préférentiellement 37,5 mg par ml d'échantillon à analyser.
- 10 6.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'à la première étape l'agent activateur secondaire de l'agent activateur primaire décrit précédemment, est choisi parmi la NHS (N-hydroxysuccinimide) ou la 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) ou le tétrafluorophénol (TTP), le 1-hydroxy-7-aza-benzotriazole (HOAT), préférentiellement de l'HOAT.
- 15 7.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'à ladite première étape, l'agent activateur secondaire est à une concentration comprise entre 0 et 50mg par ml d'échantillon à analyser, préférentiellement entre 15 et 30 mg par ml d'échantillon à analyser, très préférentiellement 25 mg par ml d'échantillon à analyser.
- 20 8.) Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'à la première étape le mélange est incubé pendant un temps compris entre 2 et 8 minutes, préférentiellement entre 4 et 6 minutes.
- 9.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que à la seconde étape l'amine primaire fluorescente est ajoutée à une concentration
- 25 finale comprise entre 0 et 100 mg par ml d'échantillon à analyser, préférentiellement entre 25 et 50 mg par ml d'échantillon à analyser, très préférentiellement 37,5 mg par ml d'échantillon à analyser.
- 10.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le mélange obtenu à la seconde étape est à un pH compris entre 5,5 et 11,0,
- 30 préférentiellement entre 8,0 et 9,0, très préférentiellement 8,7.
- 11.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que à la seconde étape l'amine primaire fluorescente est un composé de la famille des benzofurazanes, ou de la famille des aminophénanthrènes, ou de la famille des coumarines, ou de la famille des dérivés "dansyles", du N-1-éthylènediaminonaphthalène (EDAN), ou de la 5-aminofluorescéine (5-AF), ou
- 35

de la monodansylcadavérine (MDC) ou du chlorure de bleu du Nil (NBCl),
préférentiellement de l'EDAN.

- 5 12.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que à ladite deuxième étape, le tampon de dissolution de l'amine primaire fluorescente est un tampon borate.
- 13.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'à ladite troisième étape, le composé choisi parmi les membres de la famille des dialdéhydes est choisi parmi la naphtalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA) ou l'o-phthaldialdéhyde (OPA), préférentiellement l'OPA.
- 10 14.) Procédé selon l'une quelconque des revendication 1 à 13, caractérisé en ce que à ladite troisième étape, le membre de la famille des dialdéhydes est dissout dans un solvant organique, très préférentiellement dans l'éthanol.
- 15 15.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que à ladite troisième étape, le tampon aqueux de pH basique est choisi parmi une solution de borate, une solution de phosphate ou une solution d'hydroxyde de sodium.
- 16.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'à ladite troisième étape, le solvant mixte est à un pH compris entre 5 et 9, préférentiellement 6,5.
- 20 17.) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le pH du solvant mixte est ajusté avec une base organique ou inorganique.
- 18.) Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la base organique ou inorganique est choisie parmi une solution de borate, une solution de phosphate ou une solution d'hydroxyde de sodium.
- 25 19.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé en ce qu'à ladite troisième étape, le solvant organique constituant le solvant mixte (solvant organique/eau) est avantageusement choisi parmi tout solvant organique miscible à l'eau, préférentiellement de l'éthanol.
- 30 20.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisé en ce qu'à ladite troisième étape, le dialdéhyde est à une concentration comprise entre 0 et 200mg par ml d'échantillon à analyser, préférentiellement entre 20 et 100 mg par ml d'échantillon à analyser, très préférentiellement 50 mg par ml d'échantillon à analyser.
- 35 21.) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé en ce que à la cinquième étape l'acide carboxylique de référence est choisi parmi tout acide monocarboxylique, comme par exemple l'acide acétique, l'acide

propionique, l'acide butyrique, l'acide valérique, l'acide formique, l'acide lactique, l'acide p-hydroxybenzoïque, préférentiellement l'acide acétique.

- 22.) Kit pour l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels carboxyliques contenus dans un échantillon, comprenant
- 5
- a. au moins un agent activateur primaire des carbones porteurs des groupements fonctionnels carboxyliques;
 - b. au moins une amine primaire fluorescente
 - c. au moins un composé de la famille des dialdéhydes
 - 10 d. au moins un tampon modulateur de pH
- 23.) Kit pour l'identification, la caractérisation et la quantification par détection unique des groupements fonctionnels carboxyliques, thiols et amines contenus dans un échantillon, comprenant
- 15
- a. au moins un agent activateur primaire des carbones porteurs des groupements fonctionnels carboxyliques;
 - b. au moins une amine primaire fluorescente
 - c. au moins un composé de la famille des dialdéhydes
 - d. au moins une amine non fluorescente
 - e. au moins un tampon modulateur de pH
 - 20 f. au moins un thiol non fluorescent.

1/1

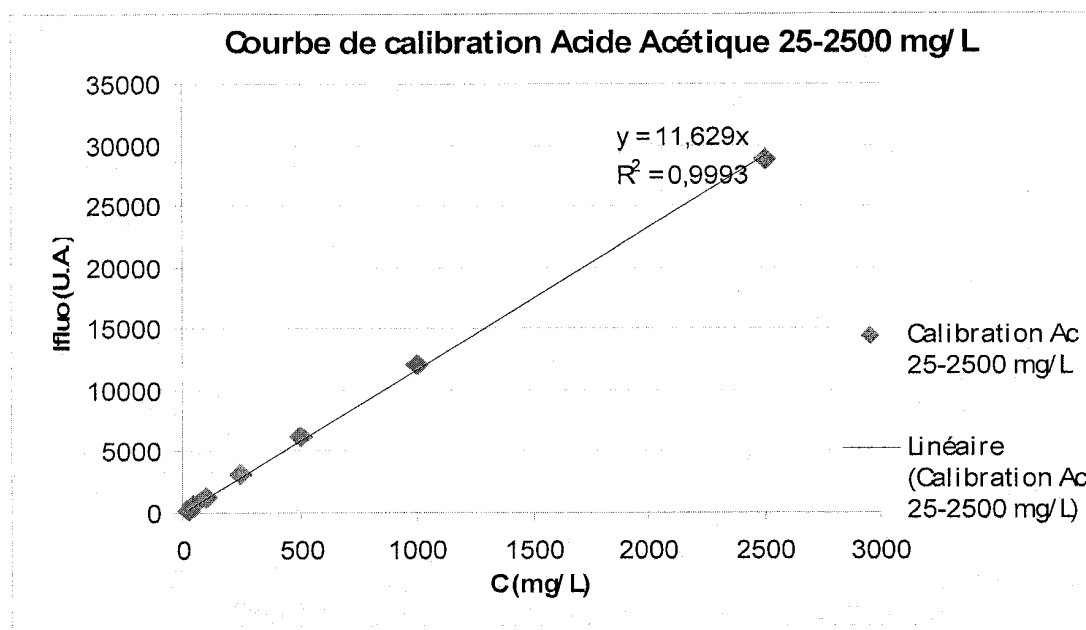


Figure 1

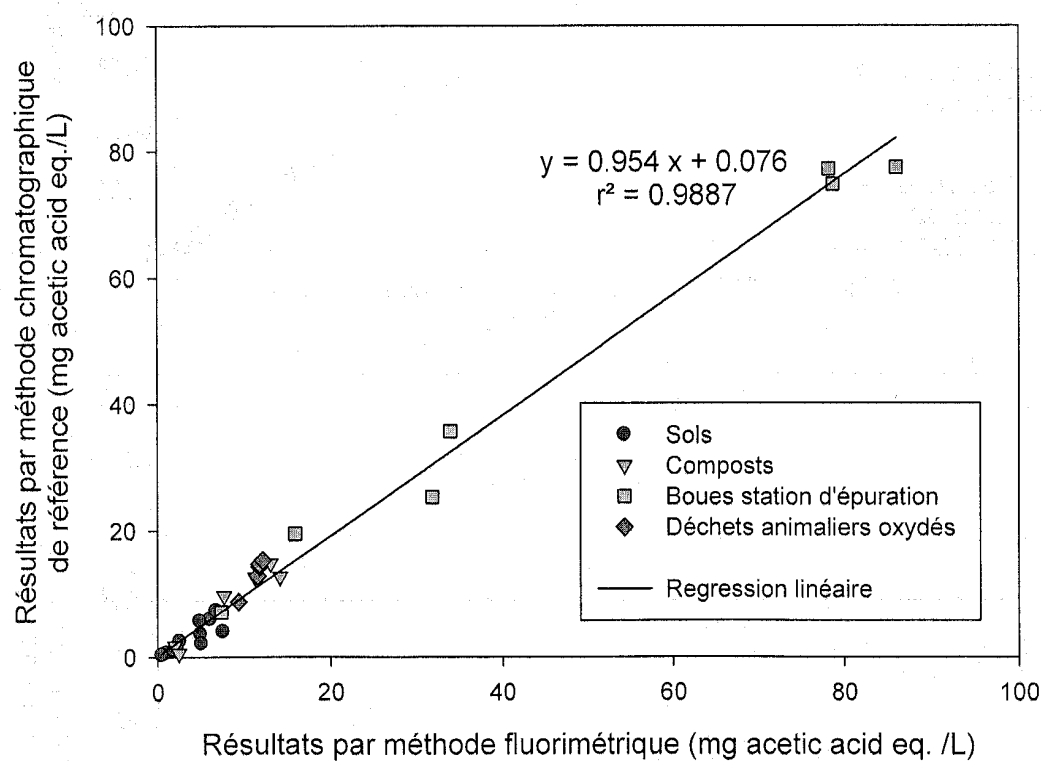


Figure 2



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 733365
FR 1000340

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
E	WO 2010/010242 A2 (UNIV PROVENCE AIX MARSEILLE 1 [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; AGRON) 28 janvier 2010 (2010-01-28) * revendications 1-9 *	22,23	G01N31/22 G01N33/18
Y	KIBLER M ET AL: "New derivatization method for carboxylic acids in aqueous solution for analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL LNKD- DOI:10.1016/S0021-9673(99)00012-6, vol. 836, no. 2, 26 mars 1999 (1999-03-26) , pages 325-331, XP004161582 ISSN: 0021-9673	22,23	
A	* abrégé * * page 325 * * Experimental Section, points 2.1, 2.3 * * points 3.2, 3.3 * * pages 327-328 *	1-21	
Y	WO 03/036260 A2 (UNIV MARYLAND [US]; KALIVRETENOS ARISTOTLE G [US]) 1 mai 2003 (2003-05-01)	22,23	G01N
A	* pages 1-3 * * page 10 *	1-21	
Y	US 3 980 433 A (TAMURA ZENZO ET AL) 14 septembre 1976 (1976-09-14)	22,23	
A	* colonne 2, ligne 20-51 *	1-21	
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 septembre 2010		Michalitsch, Richard	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 733365
FR 1000340

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	SANO A ET AL: "Fluorescence quenching properties and chemiluminescence responses of alpha-ketothiois derivatized with o-phthalaldehyde and primary amino compounds" LUMINESCENCE, JOHN WILEY & SONS LTD, GB LNKD- DOI:10.1002/BIO.592, vol. 16, no. 1, 1 janvier 2001 (2001-01-01), pages 25-28, XP002518444 ISSN: 1522-7235	22,23	
A	* le document en entier *	1-21	
Y	MONTIGNY PIERRE DE ET AL: "NAPHTHALENE-2,3-DICARBOXALDEHYDE/CYANIDE ION: A RATIONALLY DESIGNED FLUOROGENIC REAGENT FOR PRIMARY AMINES" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US LNKD- DOI:10.1021/AC00135A007, vol. 59, no. 8, 15 avril 1987 (1987-04-15) , pages 1096-1101, XP002518446 ISSN: 0003-2700	22,23	
A	* abrégé * * page 1096 - page 1098 * * tableau 3 *	1-21	
Y	KOBAYASHI M ET AL: "Water-Soluble Carbodiimide for the Fluorescent Measurement of the Carboxyl Group Produced by Enzyme Reactions" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC, NEW YORK LNKD- DOI:10.1006/ABIO.1994.1256, vol. 219, no. 2, 1 juin 1994 (1994-06-01), pages 189-194, XP024763270 ISSN: 0003-2697 [extrait le 1994-06-01]	22,23	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	* pages 189-190 *	1-21	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 septembre 2010		Michalitsch, Richard	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1000340 FA 733365

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **09-09-2010**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2010010242 A2	28-01-2010	FR 2934373 A1	29-01-2010
WO 03036260 A2	01-05-2003	AU 2002363070 A1	06-05-2003
		US 2004266016 A1	30-12-2004
		US 2010010167 A1	14-01-2010
		US 2003104609 A1	05-06-2003
US 3980433 A	14-09-1976	AUCUN	