

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 852 603**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **03 03438**

⑤1 Int Cl⁷ : C 12 M 1/14, B 01 J 4/00 // G 01 N 33/543

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 20.03.03.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 24.09.04 Bulletin 04/39.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement public à caractère scientifique et technologique — FR et UNIVERSITE JOSEPH FOURIER (GRENOBLE 1) — FR.*

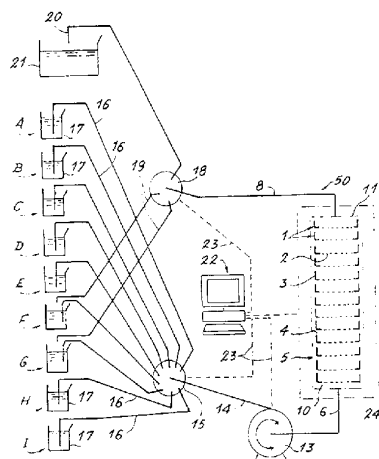
⑦2 Inventeur(s) : THELU JACQUES LUCIEN.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : GROSSET-FOURNIER CHANTAL CATHERINE.

⑤4 **INSTALLATION AUTOMATISEE POUR LA DETECTION DE LA FIXATION DE BIOMOLECULES SUR UN ECHANTILLON EN TROIS DIMENSIONS.**

⑤7 L'installation comporte une pluralité de coupelles (1) de réception d'au moins un échantillon, comportant chacune un fond perforé (2) pour le passage en continu de solutions ou réactifs liquides, ces coupelles étant superposées dans un tube (5) de confinement, un circuit (50) pour l'écoulement en continu de ces solutions provenant d'autant de réservoirs distincts (17), une électrovanne multi-voies (15), une pompe électrique (13), et un moyen de contrôle et de commande séquentiel et coordonné (22) de la pompe (13) et de l'électrovanne multi-voies (15).



FR 2 852 603 - A1



INSTALLATION AUTOMATISEE POUR LA DETECTION DE LA FIXATION DE
BIOMOLECULES SUR UN ECHANTILLON EN TROIS DIMENSIONS

La présente invention est relative à une installation automatisée pour la détection de la fixation de molécules d'origine biologique ou biomolécules sur un échantillon en trois dimensions, permettant notamment le repérage de l'expression de gènes ou de protéines par marquage sélectif de ces molécules dans la masse de l'échantillon au moyen de sondes ADN ou ARN, d'anticorps, d'enzymes ou d'une combinaison appropriée de ces marqueurs.

On connaît déjà dans la technique le procédé qui consiste à marquer sélectivement des échantillons, généralement des coupes minces, qui ne permettent pas de ce fait une observation globale de ces échantillons et limitent l'interprétation des résultats obtenus par un marquage de ceux-ci, ces mesures, effectuées en outre manuellement, étant longues, onéreuses et peu reproductibles.

On connaît également le procédé de marquage sélectif d'une structure en trois dimensions pour réaliser une hybridation au sein du volume global d'un échantillon, notamment pour la détection de l'expression de gènes ou encore d'une immuno-réaction dans le cas de la détection de protéines, ce procédé connu sous le terme d'hybridation « in toto » ou « whole mount », étant usuellement mis en oeuvre au moyen d'un automate à bras télécommandé selon les trois dimensions de l'espace.

Mais ces appareils et leurs modalités d'utilisation sont peu pratiques et surtout ne présentent pas une grande sûreté, notamment du fait

de l'exécution d'opérations discontinues de remplissage et de vidange successives des tubes ou autres récipients contenant individuellement les échantillons à traiter. De plus, ils sont totalement
5 inadaptés lorsque les solutions utilisées ainsi que les réactifs employés doivent être placés sous une pression suffisante pour pouvoir pénétrer les échantillons à coeur, surtout si ces derniers sont peu perméables comme c'est le cas avec la plupart
10 des biopsies pratiquées sur des tissus vivants.

La présente invention a pour objet une installation automatisée qui évite ces inconvénients grâce à la mise en oeuvre de moyens qui permettent une détection en continu et sous une pression
15 convenable des effets d'un marquage appliqué à un échantillon biologique en trois dimensions, notamment pour obtenir l'expression de gènes ou de protéines.

A cet effet, l'installation considérée se
20 caractérise en ce qu'elle comporte:

- une pluralité de modules en forme de coupelles individuelles de réception d'un ou plusieurs échantillons à traiter, comportant chacune une paroi latérale fermée par un fond perforé pour
25 le passage en continu à l'intérieur de la coupelle de solutions ou réactifs liquides à mettre en contact avec l'échantillon, ces coupelles présentant le même encombrement diamétral et étant logées en superposition verticale dans un tube ou une

enveloppe externe analogue de positionnement et de confinement,

- un circuit pour l'écoulement en continu à travers les coupelles dans le tube de confinement, sous pression réglable, de ces solutions, provenant
5 d'autant de réservoirs distincts, ces solutions étant introduites à la demande, ensemble ou séparément dans ce circuit,

- une électrovanne multi-voies, propre à
10 relier séparément chaque réservoir de solutions au circuit,

- une pompe électrique, de préférence à inversion du sens de pompage et de refoulement, apte à faire circuler en continu dans le circuit les
15 quantités de solutions prélevées depuis les réservoirs,

- et un moyen de contrôle et de commande séquentiel et coordonné de la pompe et de l'électrovanne multi-voies.

20 Le circuit de l'installation peut être un circuit fermé, en boucle, pour le recyclage permanent des solutions ou bien être ouvert, pour l'élimination de ces solutions après au moins un passage à travers les coupelles dans le tube de
25 confinement.

De préférence, les coupelles sont empilées dans le tube de confinement disposé verticalement, l'écoulement des solutions dans ce tube s'effectuant dans le sens ascendant.

Selon une autre caractéristique, l'installation comporte une seconde électrovanne multi-voies, permettant soit la récupération de certaines au moins des solutions pour les faire
5 circuler en boucle dans le circuit avant de les renvoyer dans leurs réservoirs respectifs, soit l'élimination de ces solutions vers un récipient d'évacuation extérieur.

Avantageusement, les coupelles de réception
10 des échantillons sont cylindriques et présentent la même hauteur d'une coupelle à l'autre. En variante cependant, les coupelles peuvent présenter des hauteurs différentes, notamment selon la taille et l'encombrement des échantillons contenus dans ces
15 coupelles.

Selon une caractéristique particulière, les coupelles de réception des échantillons, empilées dans le tube de confinement, sont immobilisées entre un fond inférieur fixe, fermant ce tube, et un fond
20 supérieur mobile, dont le déplacement à l'intérieur du tube pour s'appliquer sur l'empilement des coupelles, est commandé par un piston d'actionnement extérieur à ce tube, plongeant dans ce dernier et comportant un canal axial pour la circulation des
25 solutions dans le circuit.

De préférence, le fond mobile est équipé d'un racleur étanche, en un matériau élastique approprié, portant contre la surface interne du tube de confinement afin d'éviter la fuite de solutions
30 liquides hors de ce tube.

Avantageusement aussi, la paroi latérale de chaque coupelle est transparente et réalisée en un matériau plastique, notamment en un polymère tel que du polystyrène, du métacrylate de méthyle ou du polycarbonate.

Dans une mode de réalisation préféré, le fond de chaque coupelle est par ailleurs constitué par un tamis à mailles fines, notamment en toile de polyester ou de « Nylon ».

Selon une autre caractéristique, le tube de confinement est réalisé en verre ou en une matière plastique transparente.

Selon encore une autre caractéristique, les moyens de contrôle et de commande séquentiels comportent un micro-ordinateur qui détermine la composition, l'ordre de leur écoulement dans le circuit et la durée de mise en contact des solutions ou réactifs avec les échantillons dans les coupelles, ainsi que le débit de l'écoulement de ces solutions.

Dans un mode de réalisation préféré, le tube de confinement est logé dans une enceinte thermostatée et thermorégulée.

Avantageusement, cette enceinte thermostatée comporte une réglette métallique, collée ou autrement appliquée contre une génératrice du tube de confinement, cette réglette étant maintenue en contact avec un bloc de métal massif, contre lequel est rapporté un élément propre à réaliser un chauffage contrôlé de ce bloc.

De préférence également, le circuit comporte un serpentin scellé dans le bloc métallique, placé en série dans ce circuit en amont du tube de confinement, de sorte que les solutions ou réactifs qui traversent les coupelles empilées soient portées à la température régulée de ce bloc métallique. Notamment, le serpentin peut être réalisé en acier inoxydable et le bloc métallique en aluminium.

Utilement, le tube de confinement et la réglette métallique sont entourés par un capot de protection, de préférence en matière plastique.

Grâce à ces diverses dispositions, selon le cas mises en oeuvre ensemble ou séparément, l'invention permet de soumettre les échantillons en trois dimensions placés dans les modules formés par les coupelles superposées à l'intérieur du tube de confinement, à un flux continu de solutions ou de réactifs, évitant toute nécessité de renouvellement intermittent de ceux-ci, notamment avec des cycles successifs de remplissage et de vidange comme dans les réalisations antérieures.

L'installation proposée permet au contraire une automatisation complète du processus, grâce à la mise en oeuvre de la pompe électrique et de l'électrovanne multi-voies, ainsi qu'au pilotage coordonné de ces appareils par le micro-ordinateur.

Ce flux continu des solutions réactives a notamment pour effet d'augmenter l'efficacité de leur transfert au coeur même des échantillons contenus dans les coupelles, sans épuisement ni

stagnation de ces réactifs au contact de ces échantillons. Ceci évite que leur dépôt soit superficiel et apporte une efficacité accrue de leur pénétration au coeur de l'échantillon avec des
5 étapes globalement plus courtes.

L'installation est de plus étanche, ce qui présente un réel avantage dans le cas de l'usage d'échantillons dont la nature exige qu'ils soient confinés. Par ailleurs, la pompe électrique peut
10 être utilisée à des pressions variables, notamment supérieure à la pression atmosphérique, pour accroître le transfert des solutions ou réactifs au coeur de ces échantillons, même si ces derniers présentent une certaine imperméabilité, due par
15 exemple à une différenciation cellulaire importante.

De même, grâce à l'usage d'une relativement haute pression dans le circuit, il est possible d'analyser en profondeur certains échantillons présentant une faible pénétrabilité vis-à-vis des
20 réactifs utilisés, notamment tels que des biopsies.

L'installation présente encore l'avantage que chaque échantillon peut être traité dans celle-ci de manière sensiblement identique et parfaitement reproductible, l'expérience montrant que dans un
25 flux permanent de solutions ou de réactifs, les interférences réciproques des conditions de traitement d'un échantillon à l'autre dans des coupelles successives sont compensées par la dynamique de ce flux qui renouvelle et homogénéise
30 constamment l'environnement de ces échantillons et

n'affecte pas les résultats des mesures effectuées sur chacun d'eux.

L'installation selon l'invention autorise le recyclage en continu et de préférence dans ce cas en
5 boucle fermée des réactifs liquides les plus coûteux tels que les sondes ADN ou ARN, ou les anticorps, ces réactifs pouvant être ainsi recyclés et utilisés de façon plus diluée que dans le cas d'un procédé statique, les molécules ayant une affinité
10 particulière étant en outre piégées uniquement dans la zone spécifique de l'échantillon.

Cette installation est modulable à volonté et peut mettre en jeu un nombre d'échantillons variables, les dimensions du système étant aisément
15 adaptées au nombre des coupelles, notamment à l'aide du piston mobile et du racleur étanche qu'il comporte.

Elle est enfin conçue pour procurer une thermorégulation précise des conditions dans
20 lesquelles sont réalisées le marquage des échantillons et les mesures effectuées, sans choc thermique sur les solutions et réactifs nouvellement prélevés depuis les réservoirs et introduits dans le circuit, grâce à la circulation de ces solutions
25 dans le serpentin noyé dans le bloc métallique, préalablement à leur passage dans le tube à travers les coupelles empilées.

Ainsi, l'installation permet de modifier au gré de l'utilisateur la température adoptée, la
30 plupart des incubations pouvant être effectuées à la

température ambiante contrairement aux étapes d'hybridation qui doivent le plus généralement être réalisées à une température stable plus élevée, de l'ordre de 70°.

5 La mise en place et le retrait des échantillons et des coupelles dans ou hors de l'installation sont très faciles, pouvant être effectués de façon simple, notamment au moyen d'une pince ou outil similaire par l'extrémité du tube
10 après enlèvement de son fond supérieur mobile, l'usage d'un tube en matière transparente procurant une visibilité satisfaisante.

 Lors de la mise en place des coupelles, dont le fond perforé en mailles très fines est
15 difficilement traversé par de l'air, il est possible d'éviter de piéger celui-ci entre deux coupelles successives pendant l'introduction de ces dernières dans le tube, la bulle formée risquant de fausser ultérieurement les mesures. Dans ce but, il suffit
20 d'inverser momentanément le sens d'écoulement des solutions par la pompe afin de compenser la montée du liquide induite par la mise en place de ces coupelles, ceci avant que l'empilement de ces dernières en nombre adéquat ne soit immobilisé par
25 le piston agissant sur le fond mobile et le racleur d'étanchéité appliqués sur la coupelle supérieure dans cet empilement ; le mouvement de la pompe est ensuite inversé pour revenir au sens de circulation normal des solutions et réactifs dans le tube,
30 notamment du bas vers le haut dans celui-ci.

Pour le retrait des échantillons, il suffit de procéder de manière opposée en retirant d'abord le piston, puis en introduisant par la base du tube une quantité d'air appropriée après avoir désamorcé la
5 liaison entre la pompe et un réservoir quelconque de solution. La bulle d'air qui se forme dans ce cas à la base du tube pousse progressivement les coupelles vers le haut sous l'effet du pompage, permettant de récupérer une à une les coupelles et les
10 échantillons contenus dans celles-ci.

D'autres avantages et caractéristiques de l'installation considérée apparaîtront encore à travers la description qui suit d'un mode de réalisation de celle-ci, explicité en référence aux
15 dessins annexés, ainsi que de plusieurs exemples de protocoles pouvant être exploités avec cette installation, ces protocoles étant donnés seulement à titre indicatif et non limitatif.

Sur les dessins annexés :

20 - la Figure 1 est une vue en perspective et en coupe axiale partielle, d'une coupelle entrant dans la réalisation de l'installation considérée ;

- la Figure 2 est une vue en perspective éclatée du tube de confinement d'un empilement de
25 coupelles mis en oeuvre dans l'installation ;

- la Figure 3 est un schéma général de l'installation ;

- la Figure 4 est une vue en coupe d'un mode de réalisation également schématique du tube de

confinement des coupelles et de l'enceinte thermostatée et thermorégulée qui lui est associée.

Sur la Figure 1, la coupelle représentée, désignée dans son ensemble sous la référence 1, se compose d'un fond perforé 2, de préférence formé d'une toile de « Nylon » (Marque déposée) ou d'un matériau plastique similaire, dont la maille est choisie pour permettre sans perte de charge excessive, le libre écoulement à travers ce fond d'un flux liquide approprié, la toile présentant par ailleurs une tenue mécanique suffisante pour permettre de loger et de supporter à l'intérieur de la coupelle un échantillon en trois dimensions, sur lequel on souhaite réaliser un marquage par une sonde, un anticorps ou une enzyme, ou tout autre élément sélectif adapté.

La coupelle 1 comporte par ailleurs une paroi latérale 3 de forme générale cylindrique dans l'exemple représenté, mais dont la section pourrait être différente, cette paroi étant réunie par tout procédé de liaison convenable au bord périphérique de la toile du fond 2. La coupelle est totalement ouverte à son extrémité 4 opposée à ce fond.

La Figure 2 illustre très schématiquement, en vue éclatée, le montage d'un ensemble de coupelles 1 du genre décrit ci-dessus, ces coupelles étant prévues pour se superposer les unes aux autres continu à l'intérieur d'un tube de confinement 5.

Ce tube 5 est avantageusement réalisé en verre du type « Pyrex » (Marque déposée), ayant une

épaisseur appropriée, généralement de l'ordre de 5 mm pour présenter une résistance convenable vis-à-vis de la pression interne des solutions ainsi qu'aux chocs éventuels en cours de manipulation, tout en assurant cependant un bon échange thermique avec un ensemble de régulation en température décrit plus loin, , ou bien être constitué d'un matériau plastique transparent, notamment un polymère du genre polystyrène, métacrylate ou polycarbonate, permettant de voir l'empilement des coupelles 1 à l'intérieur de ce tube.

La section droite de ce dernier est sensiblement égale à celle des coupelles 1, de sorte qu'un écoulement d'une solution liquide appropriée, dont la nature sera précisée plus loin, introduit à la base du tube 5 par un canal de raccordement inférieur 6, notamment selon le sens ascendant représenté par la flèche 7, le tube étant disposé verticalement, traverse intégralement chacune des coupelles 1 de l'empilement pour être finalement repris à la partie supérieure par un canal d'évacuation 8, selon le sens de la flèche 9.

Le tube de confinement 5 est fermé à son extrémité basse par un fond fixe 10, dans lequel débouche le canal de raccordement 6 et comporte à son extrémité supérieure un fond mobile 11 par l'intermédiaire d'un piston 12 (non représenté) sur la Figure 2, mais qui apparaît sur la Figure 4, ce piston venant s'appuyer sur l'empilement des

coupelles 1 dans le tube 5 en bloquant chacune d'elles sur celles situées en dessous.

La Figure 3 illustre plus en détail quoique de façon schématique l'ensemble de l'installation.

5 Le canal 6 de raccordement au tube de confinement 5 est relié à une pompe électrique 13 pouvant, selon le cas, aspirer ou refouler la solution liquide qui circule à travers l'empilement des coupelles 1.

10 Cette pompe 13 est raccordée par une conduite 14 à une électrovanne 15, multi-voies, mettant en communication cette conduite 14 avec une tubulure de liaison telle que 16, montée entre une des sorties de cette électrovanne et un réservoir de solution
15 17.

Dans l'exemple de réalisation représenté, l'installation comporte neuf tubulures de liaison 16 et neuf réservoirs 17, contenant chacun une solution ou un réactif liquide différent, ces neuf réservoirs
20 étant repérés sur la Figure par les références A à I. Neuf tubulures 16 relie ainsi la pompe 15 aux neuf réservoirs 17.

Le canal d'évacuation 8, à la partie supérieure du tube de confinement 5, est relié à une
25 seconde électrovanne multi-voies 18, permettant dans l'exemple illustré, de sélectionner une parmi trois positions.

Dans ces conditions, cette électrovanne 18 peut relier le canal d'évacuation 8 du tube 5 par
30 une tubulure 19 à deux réservoirs 17 donnés, ici les

réservoirs F et G, afin de former avec le tube 5, le canal 6, la pompe 13 et la conduite 14, un circuit clos, en boucle fermée, désigné de façon générale sous la référence 50 et dans lequel circulent et
5 sont recyclés la solution ou le réactif provenant du réservoir 17 ainsi sélectionné dans les deux premières positions de l'électrovanne 18.

En variante, pour la troisième position de l'électrovanne multi-voies 18, la solution provenant
10 d'un quelconque des réservoirs 17 par sa tubulure 16 associée, après circulation dans le circuit 50 et notamment dans le tube de confinement 5, est renvoyée par une conduite 20 vers une cuve 21 d'évacuation, notamment si cette solution est
15 impropre à une nouvelle utilisation.

La commande des positions des électrovannes 15 et 18, selon l'agencement choisi pour les tubulures 16 et 19, permet de modifier à volonté le choix des solutions contenues dans les réservoirs 17 et de la
20 circulation de celles-ci en circuit fermé en boucle, ou ouvert avec élimination de ces solutions après utilisation lorsqu'il n'est pas nécessaire de les recycler.

Le contrôle du fonctionnement de la pompe
25 électrique 13, notamment son sens de pompage, et celui des électrovannes multi-voies 15 et 18, est assuré par un micro-ordinateur 22, duquel partent les liaisons 23 de commande de ces appareils, les connexions électriques n'étant pas représentées pour
30 ne pas surcharger le schéma.

Sur la Figure 3, la référence 24 désigne enfin dans son ensemble, représentée de façon très schématique, une enceinte thermostatée et thermorégulée, avantageusement prévue dans l'installation considérée et dont la réalisation apparaît plus en détail sur la Figure 4.

Le tube de confinement 5 comporte une réglette métallique latérale 25, collée ou fixée extérieurement par d'autres moyens appropriés contre une génératrice verticale de ce tube, cette réglette étant elle-même au contact d'un bloc métallique 26 sur lequel est rapportée une résistance de chauffage 27. De préférence, la réglette et le bloc sont réalisés en aluminium.

Le canal de raccordement 6 qui traverse le fond fixe 10 du tube de confinement 5 est réuni à un serpentin 28, avantageusement réalisé en acier inoxydable, rapporté et appliqué contre le bloc de métal 26 de telle sorte que la solution ou le réactif liquide qui traverse le circuit 50 soit en permanence amené à la température régulée du bloc. L'enceinte 24 est montée dans un carter extérieur de protection et d'isolation 29.

Sur la Figure 4, le fond mobile 11 à la partie supérieure du tube de confinement 5, au-dessus de l'empilement des coupelles 1, est en contact avec le piston 12, lequel se prolonge par une tige de commande 31 permettant de le manoeuvrer à l'intérieur du tube et de l'appliquer sur la coupelle supérieure. Le piston 12 comporte

latéralement un racleur 32 en un matériau élastique, assurant l'étanchéité du montage et en particulier de l'empilement des coupelles 1 à l'intérieur du tube de confinement 5.

5 Le canal d'évacuation 8 traverse le piston 12 pour déboucher dans le tube 5 et permettre la circulation de la solution dans le circuit 50.

Le tube de confinement 1 est appliqué sur le bloc 26 et maintenu par des moyens de verrouillage
10 30, avantageusement disposés aux extrémités haute et basse de la réglette 25. Le tube 5 et le piston 12 sont logés dans une extension latérale 34 du carter 29, formant capot de protection, celui-ci étant fermé en partie basse par un support isolant 33.

15 L'installation ainsi conçue permet de réaliser, de façon automatisée et en continu, le cas échéant sous pression appropriée et à température désirée, le marquage d'échantillons biologiques en trois dimensions, avec des sondes anticorps ou
20 enzymes ou encore par une combinaison de ces marqueurs, le micro-ordinateur 22 assurant en permanence le contrôle et la gestion des opérations réalisées, en modifiant dans chaque cas particulier la nature de la solution à utiliser, le temps de
25 passage sur ces échantillons de cette solution, les conditions de marquage et l'enregistrement des résultats obtenus. Il permet également de contrôler de la même façon après chaque passage de solution et/ou marquage d'un échantillon les phases

éventuellement nécessaires de rinçage du circuit avant mise en oeuvre d'une nouvelle analyse.

Les exemples donnés ci-après précisent les protocoles à suivre dans les différents cas pris en
5 considération.

Exemple 1

Mise en évidence spécifique des ARN messagers transcrits à partir du gène Wnt-11. Ces ARN
10 messagers sont révélateurs de l'activation du gène Wnt-11 sur des embryons de poulet de 3 et 4 jours de développement. Ce protocole permet de visualiser directement sur l'échantillon (embryon) le lieu d'activation du gène, cette activation de Wnt-11
15 étant révélatrice de la première étape de la formation du derme de la peau.

- Réactifs

A - 50 ml d'éthanol destiné à placer
20 l'échantillon dans le même solvant que celui d'un stockage opéré précédemment à -20°C (dénommé Et OH).

B - 50 ml de tampon phosphate (Phosphate Buffer Saline PBS), pH = 7,2 et 50µl de détergent Tween 20, destiné à réhydrater progressivement l'échantillon
25 tout en conservant l'iso-tonicité et le pH physiologique nécessaire au bon fonctionnement des réactifs utilisés ultérieurement.

Le détergent est destiné à faciliter le transit des réactifs au sein de l'échantillon.
30 (dénommé PBT).

C - 10 μ l de protéinase K (à 10mg/ml) dans 10 ml de réactif B. Cette enzyme est destinée à perméabiliser partiellement l'échantillon, en dégradant certaines protéines membranaires, afin
5 d'améliorer la pénétration au sein de l'échantillon des réactifs utilisés par la suite (dénommé Pro K).

D - Fixateur 5,4 ml de formaldéhyde à 37% ; 200 μ l EDTA (Ethylène Diamine Tétracétate) à 0,5M ; 50 μ l de Soude à 1M, quantité suffisante pour 50 ml
10 PBS. Le fixateur est destiné à consolider l'échantillon qui a été partiellement fragilisé par la protéinase K. (dénommé Fix).

E - 25 ml de formamide, 12,5 ml de tampon SSC 20x (Sodium Saline Citrate), 12,5 ml d'eau, 50 μ l de
15 Tween 20. Cette solution de pré-hybridation est destinée à placer l'échantillon dans les conditions idéales favorisant l'hybridation spécifique de la sonde ARN simple brin sur l'ARN messager transcrit dans les cellules de l'échantillon (dénommé Mix).

20 F - 5 μ l de sonde (Wnt-11), constituée d'un ARN messager anti-sens simple brin, obtenu par la transcription d'un ADN double brin codant pour la protéine Wnt-11. Cet ADN est lui-même obtenu au préalable par recombinaison moléculaire et
25 amplification au sein d'un plasmide bactérien. L'ARN messager anti-sens est marqué au cours de sa synthèse à l'aide de nucléotides couplés chimiquement à la digoxigénine DIG. La digoxigénine joue ici le rôle de l'haptène, ou peptide pouvant

être reconnu et lié spécifiquement par un anticorps;
5 ml de réactif E (dénommé Sonde).

G - 4 ml de réactif B, 1 ml de sérum, 5 μ l
d'anticorps monoclonal d'origine murine, dirigé
5 spécifiquement contre la digoxigénine (DIG) et
couplé à l'enzyme phosphatase alcaline,
commercialisé par la société Roche (dénommé Ac).

H - Tampon NTMT, destiné à alcaliniser le
milieu et composé de 1 ml NaCl 5M, 2,5 ml MgCl₂ 1M,
10 2,5 ml Tris HCl 2M pH 9,5, 50 μ l de détergent Tween
20 en quantité suffisante pour 50 ml d'eau.

I - Réactif NBT/BCIP, destiné à révéler
l'activité enzymatique phosphatase alcaline en
produisant une coloration violette insoluble, 2,4 mg
15 levamisol, 1 comprimé NBT/BCIP, 10 ml d'eau.

- Programme

Les réactifs sont injectés dans le système,
avec un débit continu de 1 ml par minute, selon la
20 séquence suivante :

A+B : 15 mn, gradient continu de solution
aqueuse de PBT (réhydratation)

B : 10 mn, lavage par tampon PBT

C : 7 mn, perméabilisation par la protéinase
25 K.

B : 5 mn , lavage par tampon PBT

D: 15 mn, fixation des échantillons par la
formaldéhyde

B : 5 mn, lavage par tampon PBT

E : 15 mn, pré-hybridation par la solution de formamide et SSC; montée progressive en température jusqu'à 70 °C.

5 F : 360 mn, hybridation par la sonde ARN anti-sens, Wnt-11 (recyclage en continu) à 70 °C.

E : 15 mn, lavage par la solution de formamide et SSC et descente en température progressive jusqu'à l'ambiante.

B : 45 mn, lavage par tampon PBT

10 G : 360 mn, complexation de l'anticorps anti-DIG (recyclage en continu)

B : 120 mn, lavage par tampon PBT

H : 10 mn, équilibrage des échantillons par le tampon pH = 9,5

15 I : 120 mn, révélation par le substrat NTBT/BCIP .

- Résultats

20 Seules les zones de l'embryon où le gène Wnt-11 est activé (domaines d'expression) sont colorées en violet. Dans ce cas précis, ces zones correspondent à la lèvre média dorsale du dermomyotome des somites. La coloration obtenue définit une zone en pointillé, située de part et
25 d'autre du tube neural, révélant les cellules précurseur, à l'origine de la formation du derme et qui après divisions successives, vont coloniser l'embryon pour participer à la formation de la peau.

Exemple 2

Mise en évidence spécifique des ARN messagers transcrits à partir du gène Msx-1. Cet exemple est similaire à l'exemple 1 ; cependant le protocole est simplifié en ceci que la première étape de réhydratation des échantillons est déjà effectuée. La dernière étape de révélation est réalisée hors de l'appareil afin que l'expérimentateur puisse arrêter la réaction au moment voulu, en fonction de l'intensité de la coloration désirée.

La sonde ARN anti-sens Msx-1 révèle l'activation du gène Msx-1 sur des embryons de poulet de 3 et 4 jours de développement. Ce protocole permet de visualiser directement sur l'échantillon (embryon) le lieu d'activation du gène, cette activation de Msx-1 étant révélatrice de la formation de la peau et des bourgeons de membres.

- Réactifs

B - 500 ml de tampon phosphate (Phosphate Buffer Saline PBS) pH = 7,2 et 500 μ l détergent Tween 20, destiné à conserver l'iso-tonicité et le pH physiologique nécessaire au bon fonctionnement des réactifs utilisés ultérieurement. Le détergent est destiné à faciliter le transit des réactifs au sein de l'échantillon (dénommé PBT).

C - 60 μ l protéinase K (à 10 mg/ml) dans 30 ml de réactif B. Cette enzyme est destinée à perméabiliser partiellement l'échantillon en dégradant certaines protéines membranaires, afin

d'améliorer la pénétration au sein de l'échantillon des réactifs utilisés par la suite (dénommé Pro K).

D - Fixateur 5,4 ml de formaldéhyde à 37%,
200 μ l EDTA (Ethylène Diamine Tétracétate) à 0,5M,
5 50 μ l de Soude à 1M, quantité suffisante pour 50 ml
PBS. Le fixateur est destiné à consolider
l'échantillon qui a été partiellement fragilisé par
la protéinase K (dénommé Fix).

E - 25 ml de formamide, 12,5 ml de tampon SSC
10 20x (Sodium Saline Citrate), 12,5 ml d'eau, 50 μ l de
Tween 20. Cette solution de pré-hybridation est
destinée à placer l'échantillon dans les conditions
idéales favorisant l'hybridation spécifique de la
sonde ARN simple brin sur l'ARN messager transcrit
15 dans les cellules de l'échantillon (dénommé Mix).

F - 5 μ l de sonde (Msx-1) constituée d'un ARN
messager anti-sens simple brin, obtenu par la
transcription d'un ADN double brin codant pour la
protéine Msx-1. Cet ADN est lui-même obtenu au
20 préalable par recombinaison moléculaire et
amplification au sein d'un plasmide bactérien. L'ARN
messager anti-sens est marqué au cours de sa
synthèse à l'aide de nucléotides couplés
chimiquement à la digoxigénine DIG. La digoxigénine
25 joue ici le rôle de l'haptène, ou peptide pouvant
être reconnu et lié spécifiquement par un anticorps;
5 ml de réactif E (dénommé Sonde).

G - 4 ml de réactif B, 1 ml de sérum, 5 μ l
d'anticorps monoclonal d'origine murine dirigé
30 spécifiquement contre la digoxigénine (DIG) et

couplé à l'enzyme phosphatase alcaline, commercialisé par la société Roche (dénommé Ac).

H - Tampon NTMT destiné à alcaliniser le milieu et composé de 1 ml NaCl 5M, 2,5 ml MgCl₂ 1M, 5 2,5 ml Tris HCl 2M pH 9,5, 50 µl de détergent Tween 20 en quantité suffisante pour 50 ml d'eau.

- Programme

Les réactifs sont injectés dans le système, à 10 un débit continu de 1.5 ml par minute, selon la séquence suivante :

B : 10 mn, lavage par tampon PBT

C : 12 mn, perméabilisation par la protéinase K.

15 B : 5 mn , lavage par tampon PBT

D: 15 mn, fixation des échantillons par la formaldéhyde

B : 5 mn , lavage par tampon PBT

E : 20 mn , pré-hybridation par la solution de 20 formamide et SSC; montée progressive en température jusqu'à 70 °C.

F : 8 heures, hybridation par la sonde ARN anti-sens, Wnt-11 (recyclage en continu) à 70°C.

E : 20 mn , lavage par la solution de 25 formamide et SSC; descente progressive en température jusqu'à l'ambiante.

B : 45 mn , lavage par tampon PBT

G : 7 heures, complexation de l'anticorps anti DIG (recyclage en continu).

30 B : 2 heures, lavage par tampon PBT

H : 10 mn, équilibrage des échantillons par le tampon pH = 9,5

- *Résultats*

5 Seules les zones de l'embryon ou le gène Msx-1 est activé (domaines d'expression) sont colorées en violet. Dans ce cas précis, ces zones correspondent à la partie dorsale du tube neural ainsi qu'à l'AER (apical ectodermal ridge) des bourgeons de membres.

10

Exemple 3

Mise en évidence spécifique des protéines Myo-D, présentes dans les cellules précurseur du muscle. Cet exemple repose sur une révélation
15 exclusivement immunologique de la présence d'une protéine (Myo-D) à l'aide d'anticorps spécifique.

De façon résumée, l'anticorps monoclonal d'origine murine dirigé contre la protéine Myo-D est ensuite lui-même reconnu et lié à un anticorps
20 secondaire (anti immunoglobuline de souris) lui-même marque par une liaison covalente à une enzyme : la peroxydase.

- *Réactifs*

25 B - 700 ml de tampon phosphate (Phosphate Buffer Saline PBS) pH = 7,2 (700 μ l détergent Tween 20), destiné à laver l'échantillon tout en conservant l'iso-tonicité et le pH physiologique nécessaire au bon fonctionnement des réactifs
30 utilisés ultérieurement. Le détergent est destiné à

faciliter le lavage et le transfert des réactifs au sein de l'échantillon (dénommé PBT).

F - 5 μ l d'anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre la protéine Myo-D dilués dans
5 10 ml de réactif B (dénommé anticorps primaire).

G - 5 μ l d'anticorps polyclonal dirigé spécifiquement contre l'immunoglobuline de souris marqué par conjugaison à une enzyme, la peroxydase.

L'anticorps est dilué dans 10 ml de réactif B
10 (dénommé anticorps secondaire).

- Programme

Les réactifs sont injectés dans le système, à un débit continu de 1,5 ml par minute, selon la
15 séquence définie comme suit:

B : 30 mn, équilibrage des échantillons aux conditions physiologiques

F : 8 heures 30 mn, complexation de l'anticorps primaire en recyclage continu.

20 B : 2 heures, lavage des échantillons afin d'éliminer les molécules liées de façon non spécifique.

G : 8 heures, complexation de l'anticorps secondaire en recyclage continu.

25 B : 3 heures, lavage des échantillons afin d'éliminer les molécules liées de façon non spécifique.

B : lavage en recyclage continu

Révélation de l'activité enzymatique par la
30 diamino benzidine (DAB).

- Résultats

Seules les zones de l'embryon ou la protéine Myo-D est exprimée (c'est à dire présente) sont colorées en brun. Dans ce cas précis, ces zones
5 correspondent au dermomyotome des somites ainsi qu'à toutes les zones où les muscles se mettent en place dans l'embryon à ce stade.

Exemple 4

10 L'automatisation de l'appareil permet de réaliser des tâches telles que la purge des tubes afin de les remplir avec les différents réactifs utilisés. Par exemple, en reprenant l'exemple 1.

15 - Réactifs

A - 50 ml d'éthanol destiné à placer l'échantillon dans le même solvant que celui du stockage opéré précédemment à -20°C (dénommé Et OH)

B - 50 ml de tampon phosphate (Phosphate Buffer Saline PBS) pH = 7,2 et 50 µl détergent Tween 20
20 destiné à réhydrater progressivement l'échantillon tout en conservant l'iso-tonicité et le pH physiologique nécessaire au bon fonctionnement des réactifs utilisés ultérieurement. Le détergent est
25 destiné à faciliter le transit des réactifs au sein de l'échantillon (dénommé PBT).

C - 10 µl de protéinase K (à 10 mg/ml) dans 10 ml de réactif B. Cette enzyme est destinée à perméabiliser partiellement l'échantillon en
30 dégradant certaines protéines membranaires, ceci

afin d'améliorer la pénétration au sein de l'échantillon des réactifs utilisés ultérieurement (dénommé Pro K).

D - Fixateur 5,4 ml de formaldéhyde à 37% ;
5 200 μ l EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétate) à 0,5M,
50 μ l Soude à 1M, quantité suffisante pour 50 ml PBS. Le fixateur est destiné à consolider l'échantillon qui a été partiellement fragilisé par la protéinase K (dénommé Fix).

10 E - 25 ml de formamide, 12,5 ml de tampon SSC 20x (Sodium Saline Citrate), 12,5 ml d'eau, 50 μ l de Tween 20. Cette solution de pré-hybridation est destinée à placer l'échantillon dans les conditions idéales favorisant l'hybridation spécifique de la
15 sonde ARN simple brin sur l'ARN messenger transcrit dans les cellules de l'échantillon (dénommé Mix).

F - 5 μ l de sonde (Wnt-11) constituée d'un ARN messenger anti-sens simple brin, obtenu par la transcription d'un ADN double brin codant pour la
20 protéine Wnt-11. Cet ADN est lui-même obtenu au préalable par recombinaison moléculaire et amplification au sein d'un plasmide bactérien. L'ARN messenger anti-sens est marqué au cours de sa
25 synthèse à l'aide de nucléotides couplés chimiquement à la digoxigénine DIG. La digoxigénine joue ici le rôle de l'haptène, ou peptide pouvant être reconnu et lié spécifiquement par un anticorps,
5 ml de réactif E (dénommé Sonde).

G - 4 ml de réactif B, 1 ml de sérum, 5 μ l
30 d'anticorps monoclonal d'origine murine dirigé

spécifiquement contre la digoxigénine (DIG) et couplé à l'enzyme phosphatase alcaline, commercialisé par la société Roche (dénommé Ac).

H - Tampon NTMT destiné à alcaliniser le milieu et composé de 1 ml NaCl 5M, 2,5 ml MgCl₂ 1M, 2,5 ml Tris HCl 2M pH 9,5, 50 µl de détergent Tween 20 en quantité suffisante pour 50 ml d'eau.

I - Réactif NBT/BCIP destiné à révéler l'activité enzymatique phosphatase alcaline en produisant une coloration violette insoluble 2,4 mg levamisol, 1 comprimé de NBT/BCIP, 10 ml d'eau.

- Programme

Les réactifs sont injectés successivement dans le système, à un débit continu de 1 ml par minute, à raison de 15 secondes pour chaque réactif.

- Résultats

Ce délai est nécessaire et suffisant pour emplir les tubulures (volume mort) correspondant à chaque réactif. De ce fait le système est prêt pour un programme d'analyse sans risquer d'injecter de l'air ou de l'eau d'un rinçage précédent.

25 Exemple 5

L'automatisation de l'appareil permet de réaliser simplement le rinçage complet de l'installation en fin d'expérimentation. Pour cela les récipients contenant les réactifs sont remplis

d'eau tandis qu'un programme spécifique effectuée alors ce rinçage.

- Programme

5 L'eau est injectée successivement dans le circuit, avec un débit continu de 1,5 ml par mn, à raison de 10 mn pour chaque tubulure d'amenée d'un réactif.

10 - Résultats

Ce délai est nécessaire mais suffisant pour rincer soigneusement les tubulures, les conduites et les autres accessoires de l'installation où chaque réactif a circulé. Après quoi, l'ensemble est prêt
15 pour un nouveau programme d'analyse.

On réalise ainsi une installation de détection modulable et automatisée des effets d'un marquage sur des molécules d'origine biologique, de
20 conception très simple et peu coûteuse, facile à mettre en oeuvre et présentant une grande efficacité, notamment pour le traitement d'échantillons en trois dimensions.

En particulier, cette installation avec le
25 tube de confinement contenant les coupelles, et le circuit en boucle pour la circulation des solutions et réactifs liquides, peut être miniaturisée et rendue relativement compacte, permettant par l'enceinte thermostatée et thermorégulée un contrôle
30 précis de la température de fonctionnement. L'usage

d'un micro-ordinateur de contrôle et de commande pour piloter le fonctionnement peut être réalisé sous un environnement classique du type « *Windows* » (Marque déposée), permettant de créer ou de modifier
5 les programmes d'analyse et de les conserver en mémoire.

Bien entendu, il va cependant de soi que l'invention ne se limite pas au mode de réalisation plus spécialement décrit et schématiquement
10 représenté sur les dessins annexés ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes.

REVENDICATIONS

1 - Installation automatisée pour la détection
de la fixation de molécules d'origine biologique ou
5 biomolécules sur un échantillon en trois dimensions,
caractérisée en ce qu'elle comporte:

- une pluralité de coupelles individuelles (1)
de réception d'un ou plusieurs échantillons à
traiter, comportant chacune une paroi latérale (3)
10 fermée par un fond perforé (2) pour le passage en
continu à l'intérieur de la coupelle de solutions ou
réactifs liquides à mettre en contact avec
l'échantillon, ces coupelles présentant le même
encombrement diamétral et étant logées en
15 superposition verticale dans un tube (5) ou une
enveloppe externe analogue de positionnement et de
confinement,

- un circuit (50) pour l'écoulement en continu
à travers les coupelles (1) dans le tube de
20 confinement (5), sous pression réglable, de ces
solutions, provenant d'autant de réservoirs
distincts (17), ces solutions étant introduites à la
demande, ensemble ou séparément dans ce circuit,

- une électrovanne multi-voies (15), propre à
25 relier séparément chaque réservoir (17) de solutions
au circuit (50),

- une pompe électrique (13), de préférence à
inversion du sens de pompage et de refoulement, apte
à faire circuler en continu dans le circuit (50) les

quantités de solutions prélevées depuis les réservoirs,

- et un moyen de contrôle et de commande séquentiel et coordonné (22) de la pompe (13) et de l'électrovanne multi-voies (15).

2 - Installation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le circuit (50) est un circuit fermé, en boucle pour le recyclage permanent des solutions.

10 3 - Installation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le circuit (50) est un circuit ouvert pour l'élimination des solutions après au moins un passage à travers les coupelles (1) dans le tube de confinement (5).

15 4 - Installation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les coupelles (1) sont empilées dans le tube de confinement (5) disposé verticalement, l'écoulement des solutions dans le tube s'effectuant dans le sens ascendant.

20 5 - Installation selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comporte une seconde électrovanne multi-voies (18) permettant, soit la récupération de certaines au moins des solutions pour les faire circuler en boucle dans le circuit (50), soit l'élimination de ces solutions la récupération de certaines au moins des solutions ayant circulé dans le circuit en boucle (50), renvoyées dans leurs réservoirs (17) et éliminées

depuis ceux-ci vers un récipient d'évacuation extérieur (21).

6 - Installation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les
5 coupelles (1) de réception des échantillons sont cylindriques et présentent la même hauteur d'une coupelle à l'autre.

7 - Installation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les
10 coupelles (1) présentent des hauteurs différentes.

8 - Installation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les coupelles (1) de réception des échantillons, empilées dans le tube de confinement (5), sont
15 immobilisées entre un fond inférieur fixe (10), fermant ce tube, et un fond supérieur mobile (11), dont le déplacement à l'intérieur du tube pour s'appliquer sur l'empilement des coupelles, est commandé par un piston d'actionnement (12) extérieur
20 à ce tube, plongeant dans ce dernier et comportant un canal axial (8) pour la circulation des solutions dans le circuit (50).

9 - Installation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le fond mobile (11) est
25 équipé d'un racleur étanche (32), en un matériau élastique approprié, portant contre la surface interne du tube de confinement (5).

10 - Installation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la
30 paroi latérale (3) de chaque coupelle (1) est

transparente et réalisée en un matériau plastique, notamment en un polymère tel que du polystyrène, du méthacrylate de méthyle ou du polycarbonate.

11 - Installation selon l'une quelconque des
5 revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le fond (2) de chaque coupelle (1) est constitué par un tamis à mailles fines, notamment en toile de polyester ou de « Nylon ».

12 - Installation selon l'une quelconque des
10 revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le tube de confinement (5) est réalisé en verre ou en une matière plastique transparente.

13 - Installation selon l'une quelconque des
15 revendications 1 à 12, caractérisée en ce que les moyens de contrôle et de commande séquentiels (22) comportent un micro-ordinateur qui détermine la composition, l'ordre de leur écoulement dans le circuit et la durée de mise en contact des solutions ou réactifs avec les échantillons dans les coupelles
20 (1), ainsi que le débit de l'écoulement de ces solutions.

14 - Installation selon l'une quelconque des
revendications 1 à 13, caractérisée en ce que le tube de confinement (5) est logé dans une enceinte
25 (24) thermostatée et thermorégulée.

15 - Installation selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'enceinte thermostatée (24) comporte une réglette métallique (25), collée ou autrement appliquée contre une génératrice du tube
30 de confinement (5), cette réglette étant maintenue

en contact avec un bloc de métal massif (26), contre lequel est rapporté un élément (27) propre à réaliser un chauffage contrôlé de ce bloc.

16 - Installation selon la revendication 15, caractérisée en ce que le circuit (50) comporte un serpentín (28) scellé dans le bloc métallique (26), placé en série dans ce circuit.

17 - Installation selon la revendication 16, caractérisée en ce que le serpentín (28) est réalisé en acier inoxydable et le bloc métallique (26) en aluminium.

18 - Installation selon l'une quelconque des revendications 15 à 17, caractérisée en ce que le tube de confinement (5) et la réglette métallique (25) sont entourés par un capot de protection (34), de préférence en matière plastique.

1/2

FIG. 1

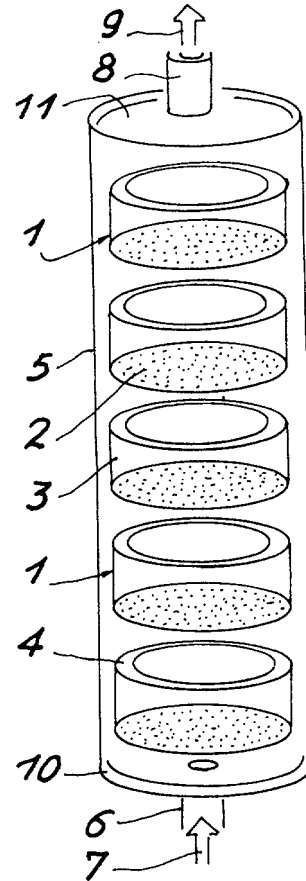
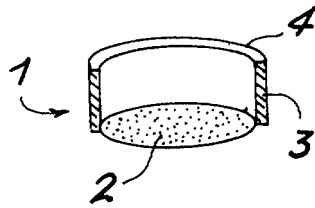


FIG. 2

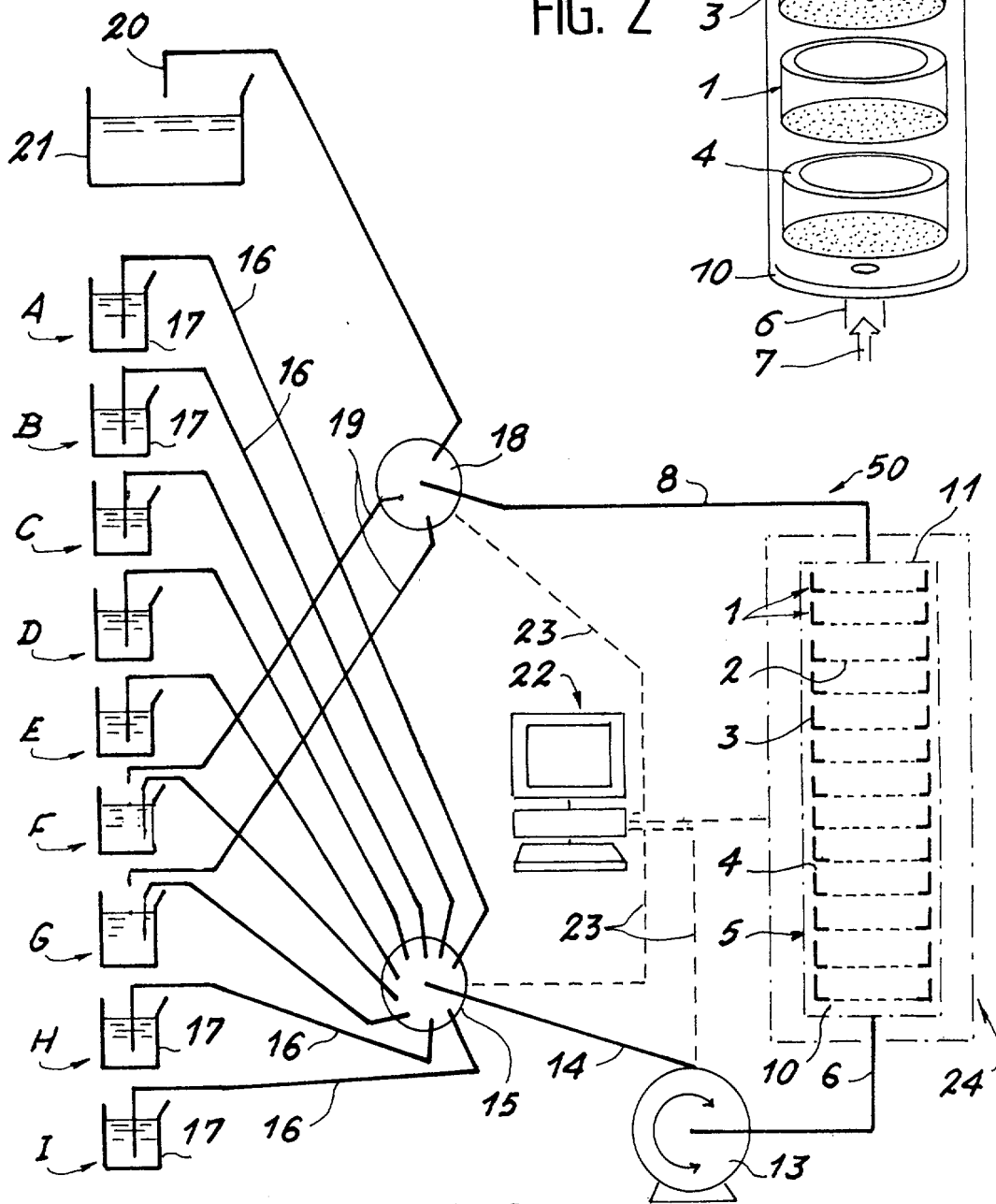


FIG. 3

212

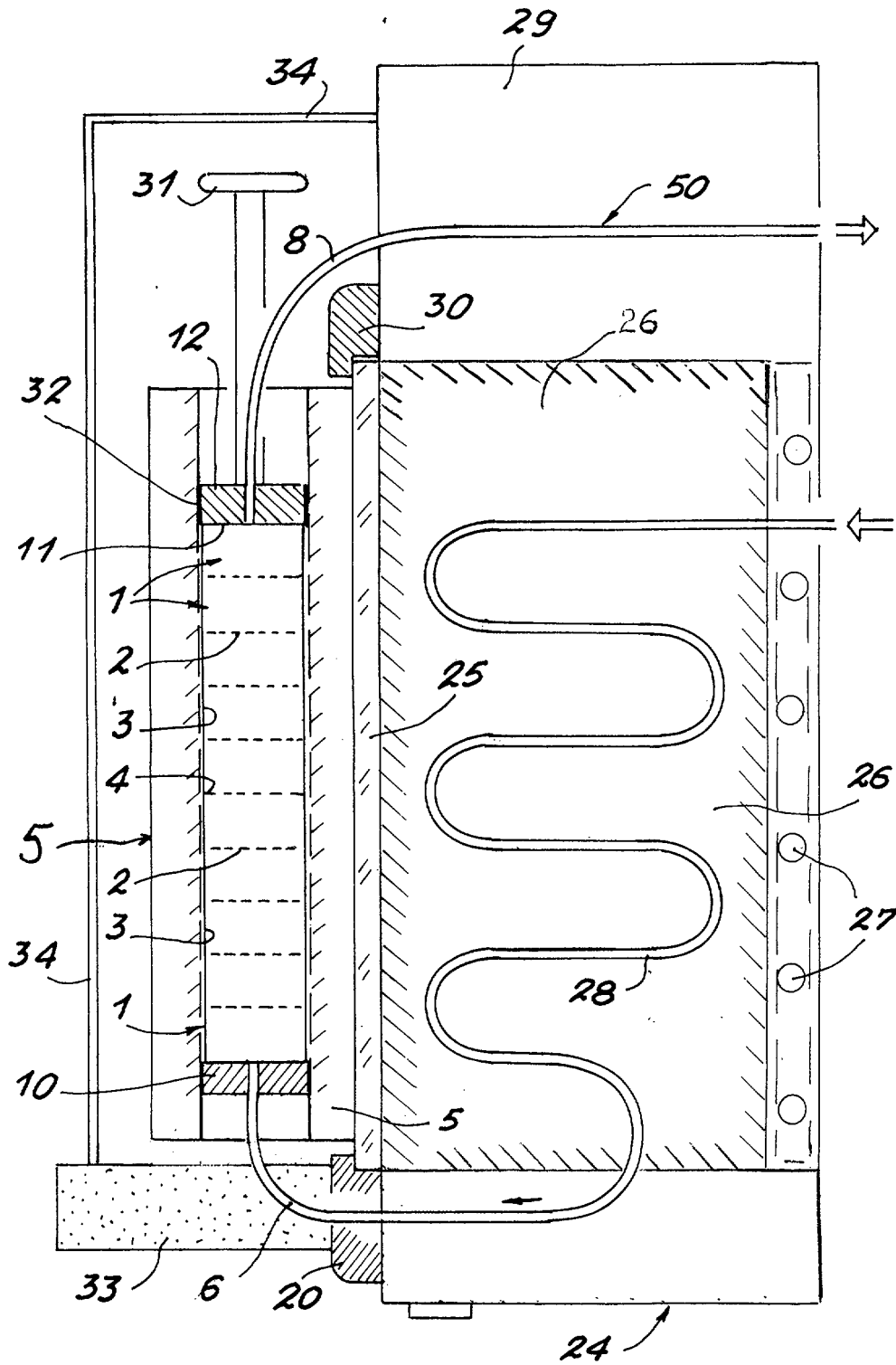


FIG. 4



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 633455
FR 0303438

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	US 5 932 418 A (NAIAD SYSTEMS) 3 août 1999 (1999-08-03) * revendications 1-24 * ---	1-18	C12M1/14 B01J4/00
A	WO 02 23167 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITES STATES OF AMERICA) 21 mars 2002 (2002-03-21) * revendications 1-28; figures 1-5 * ---	1-18	
A	WO 02 092778 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANDFORD JUNIOR UNIVERSITY) 21 novembre 2002 (2002-11-21) * revendications 1-18; figures 1-5 * ---	1-18	
A	US 2003/049862 A1 (CORNING INCORPORATED) 13 mars 2003 (2003-03-13) * revendications 1-62; figures 1-11 * -----	1-18	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			C12M C12Q
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		11 décembre 2003	Moreno de Vega, C
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		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	
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			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0303438 FA 633455**

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 11-12-2003

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
US 5932418 A	03-08-1999	AUCUN	
WO 0223167 A	21-03-2002	AU 8468101 A WO 0223167 A1 US 2002031836 A1	26-03-2002 21-03-2002 14-03-2002
WO 02092778 A	21-11-2002	WO 02092778 A2 US 2002173033 A1	21-11-2002 21-11-2002
US 2003049862 A1	13-03-2003	WO 03022421 A2 US 2003124029 A1	20-03-2003 03-07-2003