

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 12.09.01.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 14.03.03 Bulletin 03/11.

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

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : BIO MERIEUX Société anonyme —
FR et COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE —
FR.

⑦② Inventeur(s) : GINOT FREDERIC, ACHARD JEAN
LUC, DRAZEK LAURENT et PHAM PASCALE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : GERMAIN ET MAUREAU.

⑤④ PROCEDE ET DISPOSITIF D'ISOLEMENT ET/OU DETERMINATION D'UN ANALYTE.

⑤⑦ Procédé pour isoler un analyte (1) à partir d'un échantillon de départ le contenant, sur une surface réactive (9) en contact avec tout ou partie de l'échantillon de départ, caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer les étapes suivantes:

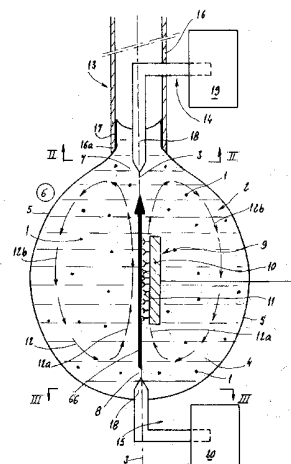
1) former et/ou maintenir une entité volumique réactionnelle (2), comprenant un milieu liquide interne (4), correspondant à tout ou partie de l'échantillon de départ, l'entité (2) présentant une interface (5) avec un milieu externe (6), présentant avec ce dernier une tension superficielle,

2) appliquer un écart de température entre au moins deux points thermiques situés:

- au voisinage et/ou
- à la surface et/ou
- au sein

de l'entité (2), lesdits points thermiques étant respectivement différents, quant à leurs températures et positionnements,

3) fixer l'analyte (1) sur la surface réactive (9), positionnée sur le trajet de convection forcée généré par l'écart de température.



La présente invention concerne, de manière générale, l'isolement d'un analyte.

Par "isoler" ou "isolement", on entend de manière générique toute technique permettant de séparer un analyte, mais aussi d'enrichir ou concentrer en ledit analyte tout liquide le contenant, ou tout support solide en contact avec ce liquide. Mais on entend aussi, éventuellement conjointement avec la définition précédente, toute technique permettant de déterminer l'analyte, au sens d'une détection et/ou quantification de celui-ci, à partir du milieu liquide le contenant.

Par "analyte", on entend toute entité, notamment entité chimique, biochimique, ou biologique, à isoler. Au rang des analytes considérés ci-après par la présente invention, on citera les cellules, organelles, virus et bactéries, les anticorps, les fragments d'anticorps, les antigènes, les haptènes, les lectines, les sucres, les acides nucléiques, les protéines, notamment A ou G, les hormones, les récepteurs d'hormones, la biotine, l'avidine, la streptavidine, et d'une manière générale toutes molécules ou macromolécules, naturelles ou synthétiques, ou analogues, à déterminer, c'est-à-dire à détecter et/ou à quantifier.

Plus particulièrement, la présente invention sera introduite et discutée par référence aux analyses biologiques, notamment moléculaires, pour lesquelles l'échantillon liquide de départ comprend ou contient un analyte du type macromolécule biologique, telle que protéine ou acide nucléique.

Différents formats d'essais biologiques de type hétérogène, tels que ceux dits ELISA, comportent une étape, dite d'incubation, au cours de laquelle un milieu liquide intermédiaire, dans lequel se trouve distribué l'analyte obtenu à partir de l'échantillon de départ, est mis en contact avec une surface réactive, c'est-à-dire une surface obtenue à partir d'un substrat et d'un réactif de liaison spécifique avec l'analyte, distribué et fixé sur ladite surface.

La performance d'une telle étape, ayant pour objet de capturer l'analyte, détermine celle du procédé d'analyse mis en œuvre, en termes de spécificité, sensibilité, précision, ou rapidité.

Cette performance dépend quant à elle d'un certain nombre de facteurs qu'il convient d'examiner, pour bien comprendre les limites des méthodes d'analyse mises en œuvre aujourd'hui dans le domaine de la biologie moléculaire (analyse d'acides nucléiques par exemple) et des immunodosages.

Un facteur a trait à l'exposition effective de la surface active à tout l'analyte distribué dans le milieu liquide. En pratique, la seule diffusion moléculaire (par agitation thermique) est insuffisante pour amener vers la surface réactive les molécules d'analyte qui sont séparées de ladite surface par
5 une distance supérieure à quelques centaines de microns. En conséquence, par simple diffusion, seule une quantité limitée de l'analyte atteint la surface réactive.

Différentes solutions ont été proposées pour contrecarrer les limites de toute la diffusion moléculaire :

10 a) il a été proposé d'agiter le milieu liquide, au contact de la surface réactive ; une telle solution ne fonctionne plus dès que le volume du milieu liquide est relativement faible ou le puits trop profond, comme c'est le cas avec les puits d'une plaque de micro-titration à 384 puits ou plus, dont le volume élémentaire peut ne pas excéder 200 μ l par puits,

15 b) il a aussi été proposé de créer un écoulement du milieu liquide, en général de manière laminaire, au contact de la surface réactive. Cette solution impose de mettre en œuvre une pompe mécanique, et de mettre en mouvement des volumes relativement importants, ce qui diminue la vitesse de liaison spécifique entre la surface réactive et l'analyte,

20 c) il a aussi été proposé de diminuer la quantité du milieu liquide, mettant en œuvre un réactif intermédiaire, à l'état divisé, par exemple des particules magnétiques comprenant un support magnétique et un agent de capture de l'analyte, lié audit support. Ce réactif intermédiaire permet de capturer l'analyte, et peut être ensuite confiné grâce à un champ magnétique.
25 Ce confinement permet de soutirer le milieu liquide excédentaire sans prélever l'analyte. Puis, par destruction, par exemple par la chaleur, de la liaison entre le réactif intermédiaire et l'analyte, on libère ce dernier dans un volume du milieu liquide beaucoup plus faible.

Cette solution a l'inconvénient de requérir un réactif
30 supplémentaire et plusieurs étapes opératoires additionnelles.

d) il a été également proposé de diviser et distribuer la surface réactive au sein du milieu liquide, grâce à un support magnétique, divisé sous forme de particules, et fonctionnalisé avec le réactif de liaison spécifique avec
35 l'analyte. Ces particules ont une taille comprise entre 50 nm et plusieurs microns. Ces particules ayant réagi avec l'analyte peuvent être ensuite séparées par confinement magnétique comme précédemment.

Cette solution présente l'avantage d'augmenter l'aire requise pour la capture de l'analyte, du fait que le réactif de liaison spécifique est présent partout ou presque. Or, le problème surgit pendant le déroulement du test, lors de la révélation de l'analyte par un réactif de détection. Ce réactif de détection va également se fixer, à niveau faible mais non nul sur l'aire réactive, indépendamment de la présence ou non de l'analyte. Une quantité de réactif de détection proportionnelle à l'aire réactive, non spécifiquement liée à l'analyte, va générer un bruit de fond, ce qui diminue la sensibilité de l'étape d'incubation, et donc celle de la méthode d'analyse.

Un autre facteur a trait précisément à l'importance des surfaces, non réactives (car non fonctionnalisées avec le réactif de liaison spécifique), mise en contact avec l'analyte. De manière générale, ces surfaces retiennent une partie de l'analyte, par absorption par exemple, ce qui bien entendu diminue la quantité d'analyte effectivement capturée par la surface réactive proprement dite, et donc limite la sensibilité de l'étape d'incubation, et donc de la méthode d'analyse.

Il y a donc intérêt à limiter l'importance des surfaces au contact du milieu liquide, autres que la surface réactive proprement dite.

La présente invention a pour objet un procédé permettant d'accélérer la cinétique de mise en contact de l'analyte sur la surface réactive.

La solution selon l'invention rompt avec les méthodes traditionnelles d'analyse, en particulier d'analyse biologique, en proposant un procédé, notamment d'incubation, consistant au moins à :

1) former et/ou maintenir, pendant la durée de ladite étape, une entité volumique réactionnelle ayant une forme symétrique autour d'un axe de référence, constituée uniquement par un milieu liquide dit interne, dans lequel est distribué l'analyte obtenu à partir de tout ou partie de l'échantillon liquide de départ, ladite entité réactionnelle présentant une interface avec un milieu externe, éventuellement confiné, différent du milieu interne, présentant avec ce dernier une tension superficielle, ladite interface ayant une surface développée fermée autour dudit axe de référence,

2) générer un gradient thermique selon l'axe de référence, au travers de l'entité réactionnelle, en sorte de déterminer dans cette dernière une zone chaude et une zone froide, induire une variation de la tension superficielle de l'interface, parallèlement à l'axe de référence, et mettre en mouvement le milieu interne selon un trajet fermé de micro-convection forcée, comprenant

une circulation axiale aller de la zone froide à la zone chaude, et une circulation périphérique retour de la zone chaude à la zone froide,

3) placer la surface réactive au contact du milieu interne de l'entité réactionnelle, sur le trajet de micro-convection forcée dudit milieu interne.

5 Grâce à l'invention, il n'existe pratiquement au sein du milieu liquide aucun volume mort, et la quasi-totalité du liquide constituant le milieu interne se trouve amenée au contact de la surface active.

La solution selon l'invention permet donc d'augmenter directement la sensibilité du procédé de détermination de l'analyte, et ainsi d'améliorer encore le rendement de techniques telles que l'amplification s'agissant d'un
10 analyte du type acide nucléique.

Préférentiellement, le réactif de liaison spécifique est un ligand.

On entend par "ligand", un élément capable de former, par un lien physique, un complexe avec l'analyte.

15 A titre d'exemple de ligand, on peut citer les anticorps, les fragments d'anticorps, les antigènes, les haptènes, les lectines, les sucres, les acides nucléiques, les protéines notamment A ou G, les hormones, les récepteurs d'hormones, la biotine, l'avidine ou la streptavidine, et d'une manière générale, les ligands naturels ou synthétiques, et les analogues de
20 ligands modifiés, pouvant entrer en compétition avec les ligands.

Tout ligand tel que précédemment défini est immobilisé sur un support par un moyen quelconque tel qu'adsorption, covalence, chélation, reconnaissance moléculaire, et capable de retenir l'analyte, seul ou conjugué à un autre ligand.

25 On entend par "support" tout type de support, polymère, inorganique ou métallique. A titre d'exemple de supports polymères, on peut citer les supports plastiques à base de polystyrène, poly(méth)acrylates, polybutadiènes, polypropylène, ou d'autres, seuls ou sous forme de copolymères. A titre d'exemple de supports inorganiques, on peut citer l'oxyde
30 de silicium, le silicium, le mica, le verre, le quartz, l'oxyde de titane, l'oxyde de vanadium. A titre d'exemple de supports métalliques, on peut citer l'or, l'argent.

L'immobilisation des ligands sur le support peut s'effectuer, soit par simple adsorption sur le support natif ou modifié, soit par l'intermédiaire d'une réaction chimique de fonctionnalisation, ou physique, permettant de modifier la
35 surface du support, et ainsi de permettre la fixation du récepteur par des liens

de covalence, ou d'autres moyens traditionnels bien connus de l'homme de l'art.

Dans la description ci-après, on entend par "particule" toute particule d'un support polymère, inorganique ou métallique, sur laquelle il est possible de greffer un ligand. En particulier, sont considérées comme tombant dans le champ de la présente invention, les particules pouvant être séparées par l'action d'un moyen physique extérieur, par exemple par voie magnétique ou électrique, ou sous l'effet de la gravité ou par centrifugation. Ressortent de la définition précédente, les particules de faible taille, notamment superparamagnétiques, dont la vitesse de sédimentation sous l'effet de la gravité est inférieure à l'agitation thermique, mais pouvant constituer des agrégats par tout procédé permettant de les réunir entre elles, ou de les assembler sur des particules de plus grosses tailles, séparables par un moyen physique quelconque.

A titre d'exemple de particules polymères, on peut citer les particules obtenues par polymérisation en émulsion telles que les latex, ou des particules de plus grosse taille, magnétiques ou non.

A titre d'exemple de particules métalliques, on peut citer l'or colloïdal, les particules ferro-, ferri-, para- ou superparamagnétiques, recouvertes ou non de polymères naturels ou synthétiques, dont la composition comprend le fer ou d'autres métaux comme le cobalt, le nickel, seuls ou sous forme d'alliages, magnétiques ou non.

A titre d'exemple de particules inorganiques, on peut citer les particules à base de silice ou de silicium, magnétiques ou non.

On entend par "détermination", toute méthode permettant de mettre en évidence la présence et/ou de quantifier l'analyte lié à la surface réactive.

A titre d'exemple de méthode de détermination, on peut citer toutes méthodes traditionnelles, à l'aide d'un marqueur par exemple, notamment par fluorescence, et d'une manière générale, toutes techniques non citées ici, mais équivalentes, par exemple colorimétriques, enzymatiques ou chronogéniques.

La présente invention est maintenant décrite par référence au dessin annexé dans lequel :

- la Figure 1 représente, à échelle agrandie, et de manière schématique, un dispositif conforme à la présente invention; les Figures 2 et 3 représentent une vue en coupe du dispositif selon Figure 1, respectivement

selon coupes II-II et III-III ; c'est à partir de ces Figures 1 à 3 que sera explicité le procédé selon l'invention, et ses principes,

- les Figures 2, 4 d'une part, et 5 et 6 d'autre part, représentent respectivement deux autres modes d'exécution d'un dispositif selon l'invention, toujours de manière schématique ; le détail représenté ou schématisé par la Figure 6 met en évidence une particule ou microparticule, telle que
5 présentement considérée par la présente invention, associée à un agent de capture de l'analyte,

- les Figures 7 à 11 représentent, en vue partielle et schématique, respectivement d'autres variantes d'exécution d'un dispositif selon l'invention,
10

- la Figure 12 représente, toujours de manière schématique, de côté et partiellement en coupe, une autre variante d'exécution d'un dispositif selon l'invention ; la Figure 13 est une vue en coupe selon XIII-XIII du dispositif montré à la Figure 12,

- la Figure 14 représente, de manière schématique, une autre variante d'exécution de la présente invention,
15

- la Figure 15 représente, de manière schématique, un montage expérimental, ayant permis de mettre en évidence la pertinence du procédé selon l'invention, mis en œuvre avec l'un quelconque des dispositifs de micro-analyse selon figures 1 à 14.
20

Par référence à la Figure 1, un dispositif selon l'invention comprend :

a) – Des moyens (13) pour former et/ou maintenir une entité volumique réactionnelle (2), par exemple une goutte, ayant une forme
25 symétrique autour d'au moins un axe de référence (3) ; cette goutte est constituée uniquement par un milieu liquide, dit ci-après milieu interne (4), dans lequel est distribué (en solution et/ou suspension) un analyte ; cette entité réactionnelle (2) présente un interface (5), de profil généralement convexe, avec un milieu externe 6 différent du milieu interne, en sorte que les milieux
30 interne (4) et externe (6) présentent entre eux une tension superficielle ; et l'interface (5) a une surface développée fermée, autour de l'axe de référence (3),

b) – Des moyens (14 et 15) d'application d'un écart de température, disposés par rapport aux moyens (13) de formation et/ou maintien
35 de l'entité réactionnelle (2), en sorte d'aligner un gradient thermique (66) avec l'axe de référence (3), au travers de l'entité réactionnelle (2), et en sorte de

déterminer dans cette dernière une zone dite chaude (7) et une zone dite froide (8), de part et d'autre de l'axe de référence (3) ; ce gradient thermique induit une variation de la tension superficielle de l'interface (5), parallèlement à l'axe de référence (3), ce qui met en mouvement le milieu interne (4) selon un trajet
5 (12) fermé de micro-convection forcée, lequel comprend une circulation axiale aller (12a), de la zone froide (8) à la zone chaude (7), et une circulation périphérique retour (12b) de la zone chaude (7) à la zone froide (8),

c) – Une surface réactive (9), obtenue à partir d'un substrat (10) sur lequel est fixé un réactif (11) de liaison spécifique avec l'analyte (1), le
10 réactif de liaison étant distribué et fixé (par liaison chimique covalente et/ou adsorption) sur ledit substrat; la surface réactive (9) est disposée par rapport aux moyens (13) de formation et/ou maintien de l'entité réactionnelle (2), en sorte d'être placée au contact du milieu interne (4), sur le trajet (12) de micro-convection forcée du milieu interne (4).

15 Les moyens (13) de formation et/ou maintien de l'entité réactionnelle (2) comprennent un tube (16), par exemple capillaire, dont l'extrémité libre ouverte (16a) est adaptée pour la formation et la suspension de l'entité réactionnelle (2), c'est-à-dire d'une goutte du milieu interne (4). L'intérieur du tube (16) est revêtu d'une couche (17) d'un matériau hydrophile,
20 limitée en longueur ou hauteur à l'extrémité libre (16a), et éventuellement une couche d'un matériau hydrophobe revêt le reste de la surface intérieure du tube (16).

Les moyens de génération du gradient thermique (66) comprennent des moyens de chauffage (14) échangeant de la chaleur avec le
25 milieu interne (4) de l'entité réactionnelle (2), du côté de la zone chaude (7), et des moyens de refroidissement (15), échangeant du froid avec le milieu interne (4) précité du côté de la zone froide (8).

A titre d'exemple, et de manière non limitative, les moyens de chauffage (14) et/ou les moyens de refroidissement (15) comprennent un
30 élément métallique (18), dont l'extrémité libre est pointue ou biseautée, disposé coaxialement à l'axe de référence (3), et immergé à son extrémité libre au sein du milieu interne (4) de l'entité réactionnelle (2). Ce même élément métallique est relié thermiquement à l'autre extrémité à une source chaude (19), ou à une source froide (20) selon le cas. Chacune de ces sources peut être constituée
35 par un bain liquide thermostaté, ou par un module thermique à effet PELTIER.

A titre d'exemple, les moyens de chauffage (14) ou les moyens de refroidissement (15) sont constitués par le milieu externe ; ou les moyens de chauffage (14) et/ou les moyens de refroidissement (15) sont constitués par un ou des éléments métalliques (18).

5 De manière non représentée, le dispositif selon l'invention comprend une enceinte de confinement du milieu externe (6), par exemple de l'air ambiant saturé en humidité.

Le dispositif précédemment décrit permet de mettre en œuvre, ou s'intègre dans tout procédé pour isoler l'analyte (1), à partir d'un échantillon de
10 départ le contenant. Ce dispositif permet la mise en œuvre d'un procédé, comprenant les étapes suivantes, indépendamment de leur ordre chronologique.

a) - Former et/ou maintenir l'entité volumique réactionnelle (2), ayant une forme symétrique autour d'au moins l'axe de référence (3), cette entité
15 étant constituée uniquement par un milieu liquide, ou milieu interne (4), dans lequel est distribué l'analyte (1), obtenu à partir de tout ou partie de l'échantillon de départ ; comme dit plus haut, cette entité réactionnelle (2) présente une interface (5) avec le milieu externe (6), éventuellement confiné, ce milieu externe étant différent du milieu interne (4), et présentant de ce fait avec celui-
20 ci une tension superficielle ; comme le montre la Figure 1, l'interface (5) a une surface développée fermée, de profil convexe, autour de l'axe de référence (3).

b) – Par l'application d'un écart de température, générer un gradient thermique (66) selon l'axe de référence (3), au travers de l'entité réactionnelle (2), en sorte de déterminer dans cette dernière la zone chaude (7)
25 et la zone froide (8) ; comme dit plus haut, c'est ce gradient thermique qui induit une variation de la tension superficielle le long de l'interface (5), parallèlement à l'axe de référence (3), ce qui met en mouvement le milieu interne (4) selon le trajet fermé (12) de micro-convection forcée, comprenant, et une circulation axiale aller (12a), de la zone froide (8) à la zone chaude (7), et
30 une circulation périphérique retour (12b), de la zone chaude (7) à la zone froide (8).

c) – Eventuellement, disposer de ou obtenir la surface réactive (9), comprenant les substrat (10) et le réactif (11) de liaison spécifique avec l'analyte (1), ce réactif de liaison étant distribué et fixé sur cette surface,

35 d) – Placer la surface réactive (9), sur le trajet (12) de micro-convection forcée du milieu interne (4).

Préférentiellement, l'entité volumique réactionnelle (2) a un volume au plus égal à 300 μl , et préférentiellement compris entre 0,1 et 100 μl , par exemple quelques dizaines de μl . Le volume de 5 μl est utilisé, car correspondant au volume d'une goutte.

- 5 La tension superficielle du milieu interne (4), par rapport au milieu externe (6), est au moins égale à 10 N/m, et préférentiellement comprise entre 10^{-2} et 1 N/m.

Préférentiellement, le milieu liquide interne comprend de l'eau, et est par exemple une solution aqueuse dans laquelle l'analyte (1) est suspendu
10 et/ou dissout. Par exemple, s'agissant d'un analyte du type ligand biologique, tel que anticorps ou antigène, ou séquence nucléotidique, le milieu liquide interne est un tampon comprenant, outre de l'eau, différents ingrédients ou agents, tels que sels, composés organiques, etc. Dans ce cas, préférentiellement, le milieu externe (6) est de l'air chargé en vapeur d'eau.

- 15 Comme le montre la figure 1, l'axe de référence (3) est disposé verticalement, et le cas échéant, en correspondance, le gradient thermique (66) est disposé de bas en haut.

Ce gradient thermique (66) est donc généré en apportant au milieu interne (4), du froid dans la zone froide (8) de l'entité réactionnelle (2), et du
20 chaud dans la zone chaude (7) de cette même entité réactionnelle, par exemple avec les moyens précédemment décrits, étant entendu que la chaleur peut être apportée dans la zone chaude (7), ou extraite dans la zone froide (8), par tous autres moyens ; ainsi la chaleur peut être apportée par illumination de la zone chaude (7) avec un faisceau infra-rouge ou laser.

- 25 Comme montré à la Figure 1, on génère le gradient thermique (66) en apportant au milieu interne (4) du chaud dans la zone chaude (7) de l'entité réactionnelle (2), et le chaud est apporté, à titre d'exemple, par échange conductif avec un élément de chauffage, sous forme de la tige métallique (18), disposé au moins pour partie au sein du milieu interne (4), du côté de son
30 extrémité chaude (7).

La surface réactive (9) est complètement immergée au sein du milieu interne (4), entre la zone chaude (7) et la zone froide (8), par exemple au plus près de l'axe de référence (3).

- 35 Préférentiellement, la surface réactive (9) est positionnée au plus près de l'axe de référence (3), car l'ensemble des trajets (12) de micro-

convection forcée passent tous à cet endroit, comme on le comprend par l'observation des Figures 1 à 3.

Pour maintenir l'intégrité de l'entité réactionnelle (2), et en particulier lui assurer une durée de vie compatible avec la durée de mise en œuvre du procédé, la température dans la zone chaude (7) de l'entité réactionnelle (2) est maintenue à une valeur inférieure à la température d'ébullition du milieu interne (4), et la température dans la zone froide (8) de cette même entité est maintenue à une valeur supérieure à la température de congélation du milieu interne (4).

Selon l'invention, en faisant varier le gradient thermique (66), dont la valeur nominale est par exemple égale à au moins 30°C, on contrôle la vitesse de la micro-convection forcée du milieu interne (4).

Conformément à la Figure 4, les moyens (13) de formation et/ou maintien de l'entité réactionnelle (2) comprennent un moyen de pose de celle-ci sur un support plan, lequel peut être constitué par un plot hydrophile (41), comme montré à la Figure 9, ou par une zone hydrophile (42) d'un support (43), circonscrite par une zone hydrophobe (44), comme montré à la Figure 8.

Par « plot hydrophile », on entend un plot dont la surface supérieure est hydrophile, mais pas les flancs latéraux.

Conformément à la Figure 5 le support, limité et circonscrit à la surface extérieure de contact avec l'entité réactionnelle (2), forme un substrat pour le réactif (11) de liaison spécifique avec l'analyte (1). Les moyens de refroidissement (15) sont reliés thermiquement, par exemple par conduction, avec le support (43), et par conséquent avec la surface réactive (9), en sorte que cette dernière se trouve refroidie.

Selon la Figure 4, l'analyte (1) représenté schématiquement est un brin constitué par une séquence nucléotidique d'intérêt, par exemple appartenant à un agent pathogène, tel que bactérie ou virus.

Comme précédemment, les moyens de chauffage (14) peuvent être reliés thermiquement, le cas échéant par conduction, avec la surface réactive (9).

De manière connue en soi, comme montré par les Figures 5 et 6, l'analyte (1) est lié à une particule (25), cette dernière comprenant un support (32) et un agent de capture (33) de l'analyte (1), lié au support (32). La liaison entre le support (32) et l'agent de capture et/ou entre l'agent de capture et l'analyte est labile à la température de la zone chaude (7) de l'entité (2)

réactionnelle, et effective à toute température comprise entre celle de la zone chaude (7) et celle de la zone froide (8) de l'entité réactionnelle (2). Aux fins de la détermination de l'analyte, on distribue et suspend ces particules (25) dans le milieu interne de l'entité réactionnelle.

5 L'élément métallique (18), appartenant aux moyens de chauffage (14), est aimanté, de manière à générer un champ magnétique, permanent ou temporaire, au sein du milieu interne (4) de l'entité réactionnelle (2), ce champ magnétique demeurant spatialement à l'écart de la surface réactive (9).

10 La micro-convection forcée selon le trajet (12), en coopération avec les propriétés précitées du réactif intermédiaire (25) sous forme de particules d'une part, et le champ magnétique incorporé dans les moyens de chauffage (14), d'autre part, ont pour effet que :

- dans la circulation axiale ascendante du milieu interne, les particules (25) capturent l'analyte, puis sont confinées au contact des moyens
15 de chauffage (14), par exemple l'extrémité de la tige (18),

- au contact des moyens de chauffage, les particules (25) labiles se dissocient, et les parties dissociées sont entraînées ensemble dans la circulation périphérique descendante du milieu interne, pour aboutir au contact de la surface réactive (9),

20 - au contact de cette surface (9), refroidie, l'analyte (1) se lie spécifiquement,

- au total, comme il n'existe pratiquement pas de volume mort, c'est-à-dire non affecté par la micro-convection forcée, pratiquement tout l'analyte (1) se trouve collecté et entraîné au contact de la surface réactive (9),
25 et collecté sur cette dernière.

On se réfèrera à cet égard aux Figures 5 et 6.

Toute particule telle que précédemment définie peut être une particule magnétique qui peut être piégée par une source magnétique, telle qu'un aimant. Une telle source magnétique est située au niveau de ou
30 appartient aux moyens générant la zone chaude (7).

Conformément à la Figure 7, les moyens (13) de formation et/ou maintien de l'entité réactionnelle (2) consistent en un anneau (21) suspendu par deux branches parallèles (22), verticales et diamétralement opposées.

35 Conformément à la Figure 8, ces mêmes moyens (13) consistent en une tige pleine (23) biseautée et rainurée.

Conformément à la Figure 11, le froid est apporté par échange radiatif et /ou convection, avec un émetteur froid (30) disposé à distance de l'entité réactionnelle (2), du côté de son extrémité froide (8). Par exemple, cet émetteur froid (30) consiste en un module plat à effet PELTIER.

5 Conformément aux Figures 12 et 13, le milieu externe 6 est une phase fluidique, liquide ou gazeuse. A cette fin, on prévoit une plaque (24) d'un matériau plastique, dans laquelle est ménagée une cavité de confinement (24a) de l'entité volumique réactionnelle (2), dont l'axe de référence (3) est par exemple disposé horizontalement. Cette cavité de confinement (24a) a une
10 forme aplatie ou plane, et est donc disposée horizontalement. Cette cavité de confinement (24a) est par ailleurs fermée par un couvercle ou film (50).

Le dispositif représenté aux Figures 12 et 13 peut être obtenu par toute technique appropriée, en particulier de micro-gravure dans tout substrat compatible, tel que du silicium.

15 Comme montré à la Figure 13, la cavité (24a) a toute forme appropriée, et le milieu interne (4) est de forme ronde, voire ovale, préférentiellement symétrique par rapport à l'axe de référence (3), en sorte que les trajets (12) de micro-convection s'effectuent sans contrainte physique.

Le milieu externe (6) est confiné au sein de la cavité (24a). Il est
20 constitué par exemple d'air emprisonné, créant, selon un plan de coupe parallèle au fond de la cavité (24a) et au film (50), au niveau du milieu interne (4), une interface ronde ou ovoïde avec ledit milieu externe (6).

Conformément à la Figure 14, les moyens (13) de formation et/ou maintien de l'entité réactionnelle (2) consistent en un tube cône (16), à
25 l'extrémité libre (16a) duquel sont compris ou confondus les moyens de chauffage (14), obtenus par effet résistif, s'agissant d'un tube métallique.

Conformément à cette même Figure 14, un organe réactionnel mobile, par exemple une tige (40), est disposé à l'intérieur du tube (16), et comprend à son extrémité libre une surface réactive (9) ayant une forme
30 hydrodynamique, par exemple en forme de trépan. Cet organe réactionnel est susceptible de se déplacer entre deux positions, à savoir une position inactive, à l'extérieur de l'entité réactionnelle (2), et une position active, dans laquelle la surface réactive (9) est immergée au sein du milieu interne (4) formant l'entité réactionnelle (2).

Bien entendu, au terme de l'exécution du procédé, on détermine l'analyte (1) lié à la surface réactive (9), par tout moyen approprié, de deux manières différentes, à savoir :

- soit la surface réactive demeure au contact du milieu interne (4), pendant la détermination,
- soit la surface réactive est disposée à l'écart du milieu interne (4), au moment de la détermination.

La pertinence des principes de micro-analyse exposés précédemment a été mise en évidence selon le protocole expérimental suivant :

Tout d'abord on dispose d'un milieu liquide interne (4), constitué par un tampon dit TeNaCl, ayant la composition suivante : Triton X100 0,05 %, Tris 10 mM Ph8, EDTA, NaCl1M, ADN de sperme de saumon à 0,05%.

Dans ce milieu liquide sont dispersées et suspendues des microbilles fluorescentes, dites DIPF-8831, vendues par la Société MOLECULAR PROBES. La concentration de ces microbilles est de l'ordre de 500 unités par μ l.

La densité de ces microbilles est de l'ordre de 1,05 g/ml, ce qui est proche de la densité du milieu interne (4).

Conformément à la Figure 1, on dispose d'un tube métallique capillaire (16), ayant à son extrémité un diamètre interne de 2 mm, dont l'extrémité libre (16a) est biseautée. Cette extrémité libre est recouverte, du côté intérieur avec un revêtement hydrophile (17), consistant en de la Bovine Serum Albumine (BSA). Cette même extrémité libre est chauffée par effet résistif, comme décrit ou montré par référence à la Figure 14.

Avec le tube (16) et le milieu interne (4) précédemment exemplifié, dans lequel sont suspendues les microbilles précitées, on forme à l'extrémité libre (16a) une entité réactionnelle (2), ayant la forme d'une goutte, dont le diamètre est compris entre 1 et 2,5 mm.

Le froid est apporté, en disposant d'un élément plat de refroidissement (30), comme montré à la Figure 6, c'est-à-dire par échange radiatif et/ou convection avec l'extrémité froide (8) de l'entité (2). Préférentiellement, l'écart de température générant le gradient thermique (66) est réglé à une valeur comprise entre 10 et 65°C.

Comme montré par le montage expérimental selon Figure 15, on illumine l'entité réactionnelle (2) avec un faisceau laser He-Ne, à une longueur

d'ondes de 633 nm, tandis que les microbilles fluorescentes précitées absorbent à une longueur d'ondes de 625 nm, et réémettent à 645 nm. L'illumination laser est collimatée en sorte de déterminer, lors de sa traversée de l'entité réactionnelle (2), un plan (27) extrêmement fin, ayant une épaisseur
 5 comprise entre 50 et 100 μm . Ce plan est observé avec une caméra CDD (29), les images ainsi acquises étant traitées par tout système approprié (28).

Grâce à ce montage expérimental, on a pu établir et visualiser l'existence d'une micro-convection forcée conforme à la définition précédente, dont la vitesse varie grossièrement de 80 à 190 $\mu\text{m/s}$.

10 De manière générale, les étapes opératoires précédemment décrites et exemplifiées peuvent être généralisées à tout procédé pour isoler un analyte (1) à partir d'un échantillon liquide de départ le contenant, sur une surface réactive (9) en contact avec tout ou partie de l'échantillon de départ, et consistant à effectuer les étapes suivantes :

15 1) former et/ou maintenir une entité volumique réactionnelle (2), comprenant un milieu liquide interne (4), correspondant à tout ou partie de l'échantillon de départ, l'entité (2) présentant une interface (5) avec un milieu externe (6), présentant avec ce dernier une tension superficielle,

2) appliquer un écart de température entre au moins deux points
 20 thermiques situés :

- au voisinage et/ou
- à la surface et/ou
- au sein

de l'entité (2), lesdits points thermiques étant respectivement
 25 différents, quant à leurs températures et positionnements,

3) fixer l'analyte (1) sur la surface réactive (9), positionnée sur le trajet de convection forcée généré par l'écart de température.

Et ce procédé peut être caractérisé par les étapes suivantes (1) à (3) :

30 1) former et/ou maintenir une entité volumique réactionnelle (2) ayant une forme symétrique autour d'un axe de référence (3), constituée uniquement par le milieu liquide dit interne (4), dans lequel est distribué l'analyte (1) obtenu à partir de tout ou partie de l'échantillon de départ, ladite entité réactionnelle présentant une interface (5) avec le milieu externe (6),
 35 éventuellement confiné, différent du milieu interne, présentant avec ce dernier

une tension superficielle, ladite interface ayant une surface développée fermée autour dudit axe de référence (3),

2) générer un gradient thermique (66) selon l'axe de référence (3), au travers de l'entité réactionnelle (2), en sorte de déterminer dans cette
5 dernière une zone chaude (7) et une zone froide (8), et induire une variation de la tension superficielle de l'interface (5), parallèlement à l'axe de référence (3), et mettre en mouvement le milieu interne (4) selon un trajet fermé (12) de micro-convection forcée, comprenant une circulation axiale aller (12a) de la zone froide (8) à la zone chaude (7), et une circulation périphérique retour
10 (12b) de la zone chaude à la zone froide,

3) placer la surface réactive (9) sur le trajet (12) de micro-convection forcée dudit milieu interne.

La surface réactive (9) peut comprendre une surface indépendante des points thermiques qui génèrent l'écart de température (6), ou une surface
15 appartenant à la zone (7) ou à la zone (8).

REVENDICATIONS

1. Procédé pour isoler un analyte (1) à partir d'un échantillon de départ le contenant, sur une surface réactive (9) en contact avec tout ou partie de l'échantillon de départ, caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer les étapes
- 5 suivantes :
- 1) former et/ou maintenir une entité volumique réactionnelle (2), comprenant un milieu liquide interne (4), correspondant à tout ou partie de l'échantillon de départ, l'entité (2) présentant une interface (5) avec un milieu externe (6), présentant avec ce dernier une tension superficielle,
 - 10 2) appliquer un écart de température entre au moins deux points thermiques situés :
 - au voisinage et/ou
 - à la surface et/ou
 - au sein
 - 15 de l'entité (2), lesdits points thermiques étant respectivement différents, quant à leurs températures et positionnements,
 - 3) fixer l'analyte (1) sur la surface réactive (9), positionnée sur le trajet de convection forcée généré par l'écart de température.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par les étapes (1) à
- 20 (3) suivantes :
- 1) former et/ou maintenir, pendant la durée de ladite étape, une entité volumique réactionnelle (2) ayant une forme symétrique autour d'un axe de référence (3), constituée uniquement par le milieu liquide dit interne (4), dans lequel est distribué l'analyte (1) obtenu à partir de tout ou partie de
 - 25 l'échantillon de départ, ladite entité réactionnelle présentant une interface (5) avec le milieu externe (6), éventuellement confiné, différent du milieu interne, présentant avec ce dernier une tension superficielle, ladite interface ayant une surface développée fermée autour dudit axe de référence (3),
 - 2) générer un gradient thermique (66) selon l'axe de référence (3),
 - 30 au travers de l'entité réactionnelle (2), en sorte de déterminer dans cette dernière une zone chaude (7) et une zone froide (8), et induire une variation de la tension superficielle de l'interface (5), parallèlement à l'axe de référence (3), et mettre en mouvement le milieu interne (4) selon un trajet fermé (12) de micro-convection forcée, comprenant une circulation axiale aller (12a) de la
 - 35 zone froide (8) à la zone chaude (7), et une circulation périphérique retour (12b) de la zone chaude à la zone froide,

3) placer la surface réactive (9) sur le trajet (12) de micro-convection forcée dudit milieu interne.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la surface réactive (9) comprend une surface indépendante des points thermiques qui
5 génèrent l'écart de température (6), ou une surface appartenant à une dite zone (7 ou 8).

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'entité volumique réactionnelle (2) est une goutte.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4,
10 caractérisé en ce que le milieu externe (6) est de l'air chargé en vapeur d'eau.

6. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'axe de référence (3) est disposé verticalement, et par exemple le gradient thermique (6) est disposé de bas en haut.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on génère
15 le gradient thermique (66) en apportant au milieu interne (4) de la chaleur dans la zone chaude (7) de l'entité réactionnelle (2), et le chaud est apporté par échange conductif avec un élément de chauffage (18) disposé au moins pour partie au sein du milieu interne (4), du côté de sa zone chaude (7).

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 7,
20 caractérisé en ce que la surface réactive (9) est immergée au sein du milieu interne (4), entre la zone chaude (7) et la zone froide (8), par exemple au plus près de l'axe de référence (3).

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 8, l'analyte (1) étant lié à une particule, caractérisé en ce que, premièrement, la
25 particule, comprenant un support (32) et un agent de capture (33) de l'analyte (1), lié audit support (32), la liaison entre ledit support et ledit agent de capture et/ou entre l'agent de capture et l'analyte étant labile à la température de la zone chaude (7) de l'entité réactionnelle (2), et effective à toute température comprise entre celle de la zone chaude (7) et celle de la zone froide (8) de
30 ladite entité réactionnelle (2), et deuxièmement on distribue et suspend la particule dans le milieu interne (4) de l'entité réactionnelle (2).

10. Procédé, selon la revendication 9, caractérisé en ce que la particule est une particule magnétique qui peut être piégée par une source magnétique, telle qu'un aimant.

11. Procédé, selon les revendications 2 et 10, caractérisé en ce que la source magnétique, qui peut piéger les particules magnétiques, est située au niveau de ou appartient aux moyens générant la zone chaude (7).

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'on effectue une étape de lecture/détection au contact du milieu interne (4) à l'écart dudit milieu interne, après fixation de l'analyte (1) sur la surface réactive (9).

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la température de la zone chaude (7) de l'entité réactionnelle (2) est maintenue à une valeur inférieure à la température d'ébullition du milieu interne (4), et la température à la zone froide (8) de ladite entité est maintenue à une valeur supérieure à la température de congélation dudit milieu interne (4).

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 13, caractérisé en ce qu'on contrôle la vitesse de la micro-convection forcée (12) du milieu interne (4), par variation de l'écart de température entre les zones chaude (7) et froide (8), dont la valeur nominale est par exemple égale à 30°C.

15. Dispositif pour isoler sur une surface réactive (9) un analyte, à partir d'un échantillon liquide de départ le contenant, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) des moyens (13) pour former et/ou maintenir une entité volumique réactionnelle (2) ayant une forme symétrique autour d'au moins un axe de référence (3), constituée uniquement par un milieu liquide dit interne (4), dans lequel est distribué un analyte (1), ladite entité réactionnelle présentant une interface (5) avec un milieu externe (6) différent du milieu interne, présentant avec ce dernier une tension superficielle, ladite interface ayant une surface développée fermée autour dudit axe de référence (3),

b) des moyens (14, 15) d'application d'un écart de température, disposés par rapport aux moyens (13) de formation de l'entité réactionnelle (2), en sorte d'aligner un gradient thermique (66) avec l'axe de référence (3) au travers de l'entité réactionnelle (2), et de déterminer dans cette dernière une zone chaude (7) et une zone froide (8), de part et d'autre de l'axe de référence, induire une variation de la tension superficielle de l'interface (5), parallèlement à l'axe de référence (3), et mettre en mouvement le milieu interne (4) selon un trajet (12) fermé de micro-convection forcée, comprenant une circulation axiale

aller (12a) de la zone froide (8) à la zone chaude (7), et une circulation périphérique retour (12b) de la zone chaude à la zone froide,

c) une surface réactive (9) obtenue à partir d'un substrat (10) sur lequel est fixé un réactif de liaison (14) spécifique avec l'analyte (1), ledit réactif de liaison étant distribué et fixé sur ledit substrat ; ladite surface réactive (9) étant disposée par rapport aux moyens (13) de formation et/ou maintien de l'entité réactionnelle (2), en sorte d'être placée au contact du milieu interne (4) sur le trajet (12) de micro-convection forcée dudit milieu interne.

16. Dispositif selon la revendication 15, caractérisé en ce que les moyens (13) de formation et/ou maintien de l'entité réactionnelle (2) comprennent un moyen de suspension de cette dernière, choisi dans le groupe constitué par un tube (16), par exemple capillaire, dont l'extrémité libre ouverte (16a) est adaptée pour former et suspendre l'entité réactionnelle (2), un anneau (21), et une tige pleine (23) biseautée rainurée.

17. Dispositif selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'intérieur du tube 16 est revêtu par une couche (17) d'un matériau hydrophile, limitée en longueur ou en hauteur à l'extrémité libre (16a), et éventuellement, une couche d'un matériau hydrophobe revêt le reste de la surface intérieure dudit tube (16).

18. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 15 à 17, caractérisé en ce que les moyens de génération du gradient thermique (66) comprennent des moyens de chauffage (14) échangeant de la chaleur, avec le milieu interne (4) de l'entité réactionnelle, du côté de la zone chaude (7), et des moyens de refroidissement (15) échangeant du froid avec le milieu interne (4), du côté de la zone froide (8).

19. Dispositif selon la revendication 18, caractérisé en ce que les moyens de chauffage (14) et/ou les moyens de refroidissement (15) comprennent un élément métallique (18) disposé coaxialement à l'axe de référence (3), immergé à une extrémité au sein du milieu interne (4) de l'entité réactionnelle (2), relié thermiquement à l'autre extrémité à une source chaude (19) ou une source froide (20) selon le cas.

20. Dispositif, selon l'une quelconque des revendications 15 à 19, caractérisé en ce que les moyens de chauffage (14) ou les moyens de refroidissement (15) sont constitués par le milieu externe.

21. Dispositif, selon l'une quelconque des revendications 15 à 19, caractérisé en ce que les moyens de chauffage (14) et/ou les moyens de refroidissement (15) sont constitués par un ou des éléments métalliques (18).

22. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 15 à 21, caractérisé en ce que un élément aimanté est présent de manière à générer un champ magnétique, permanent ou temporaire, au sein du milieu interne (4) de l'entité réactionnelle (2), spatialement à l'écart de la surface réactive (9).

23. Dispositif selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'élément aimanté est constitué par un élément métallique (18).

24. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 15 à 23, caractérisé en ce que le milieu externe (6) est une phase (24) gazeuse ou liquide, inerte vis à vis du milieu interne (4), disposée au sein d'une cavité de confinement (24a) de l'entité volumique réactionnelle (2), dont l'axe de référence (3) est disposé par exemple horizontalement.

25. Dispositif selon la revendication 24, caractérisé en ce que la cavité de confinement (24a) a une forme aplatie ou plane.

26. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 18 à 21, caractérisé en ce que les moyens de refroidissement (15) et/ou de chauffage (14) sont reliés thermiquement, par exemple par conduction, avec la surface réactive (9).

27. Dispositif selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend un organe réactionnel, par exemple une tige (40), comprenant à une extrémité libre, la surface réactive (9), susceptible de se déplacer, par exemple selon l'axe de référence (3), entre deux positions, à savoir une position inactive, dans laquelle la surface réactive (9) demeure à l'extérieur de l'entité réactionnelle (2), et une position active, dans laquelle la surface réactive (9) est immergée au sein du milieu interne (4).

28. Dispositif selon la revendication 15, caractérisé en ce que les moyens (13) de formation et/ou maintien de l'entité réactionnelle (2) comprennent un moyen de pose de cette dernière, choisi dans le groupe constitué par un plot (41) et/ou une zone hydrophile (42) d'un support (43), circonscrite par une zone hydrophobe (44).

29. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 15 à 27, caractérisé en ce que la surface réactive (9) a une forme hydrodynamique.

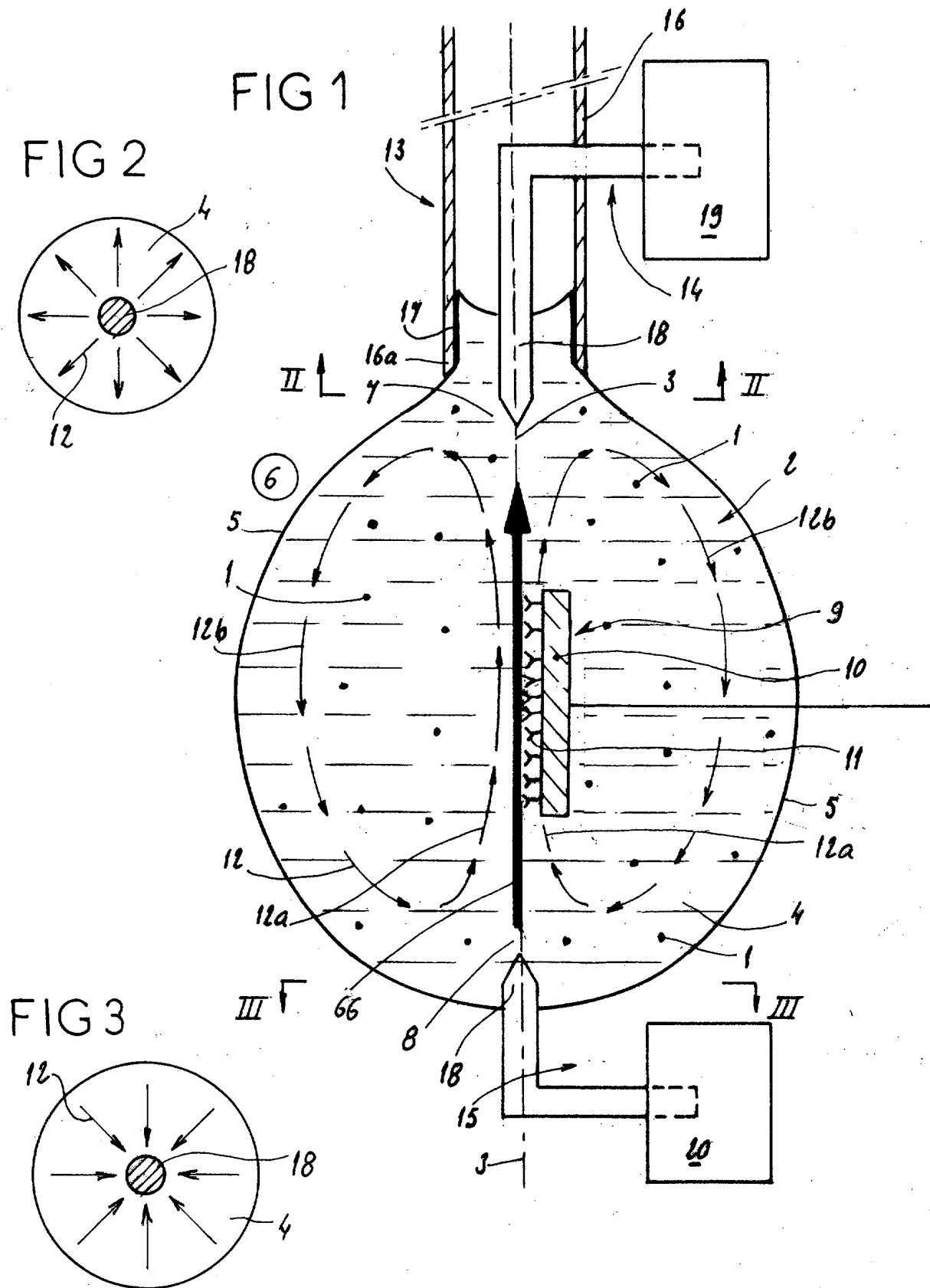


FIG 4

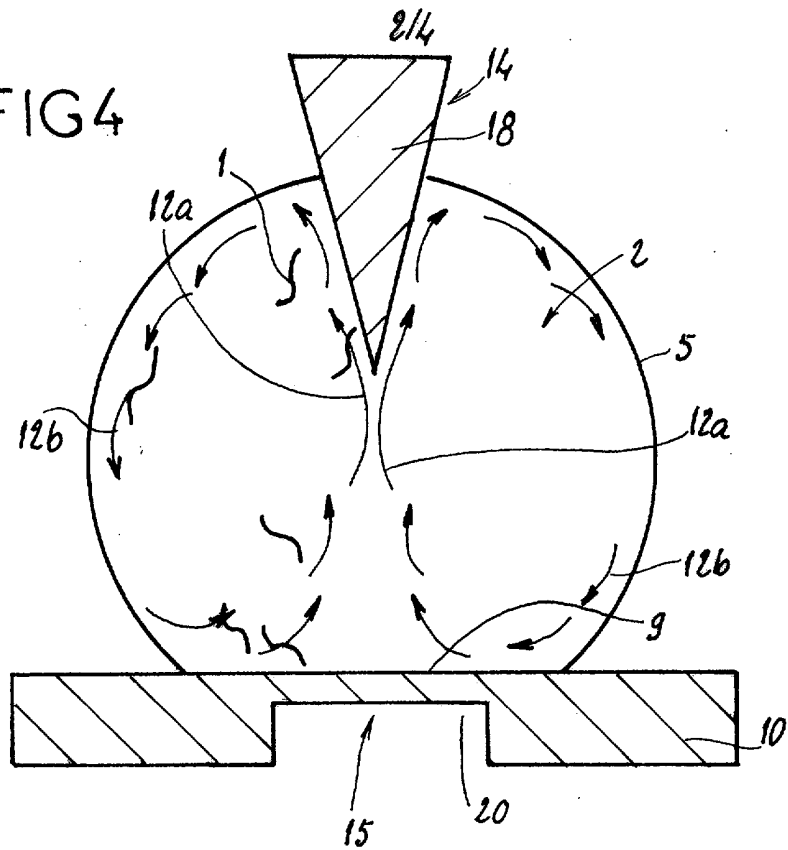


FIG 5

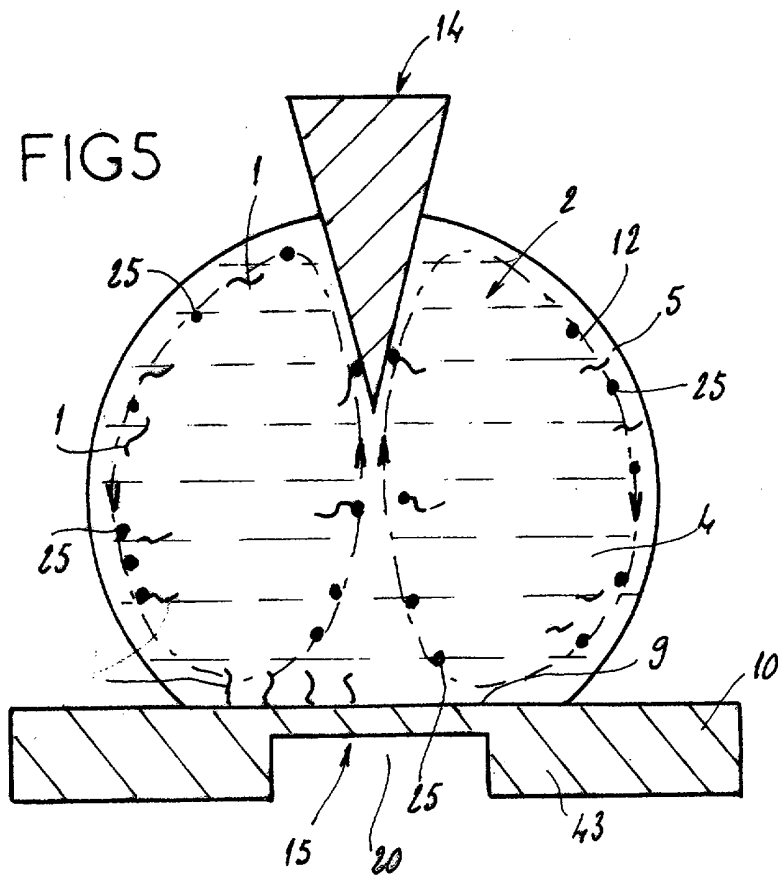


FIG 6

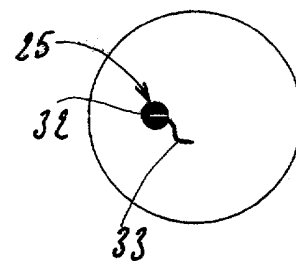
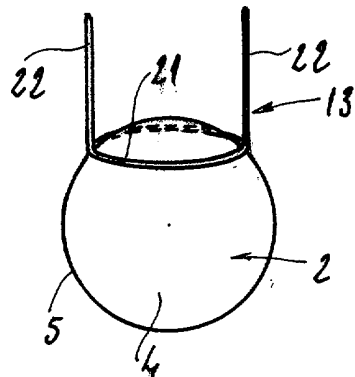


FIG 7



3/4 FIG 8

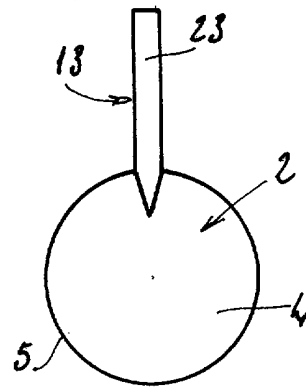


FIG 9

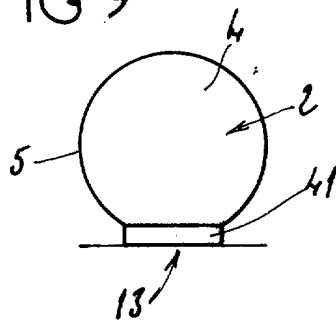


FIG 10

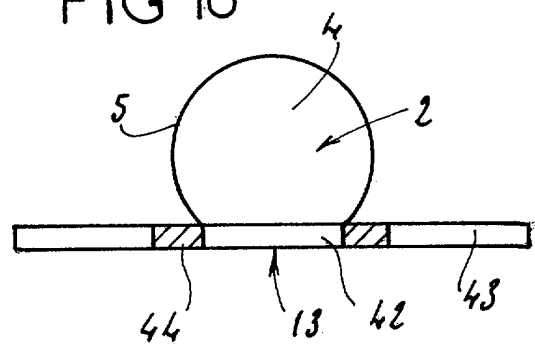
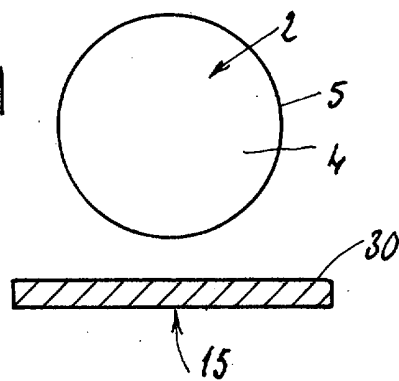


FIG 11



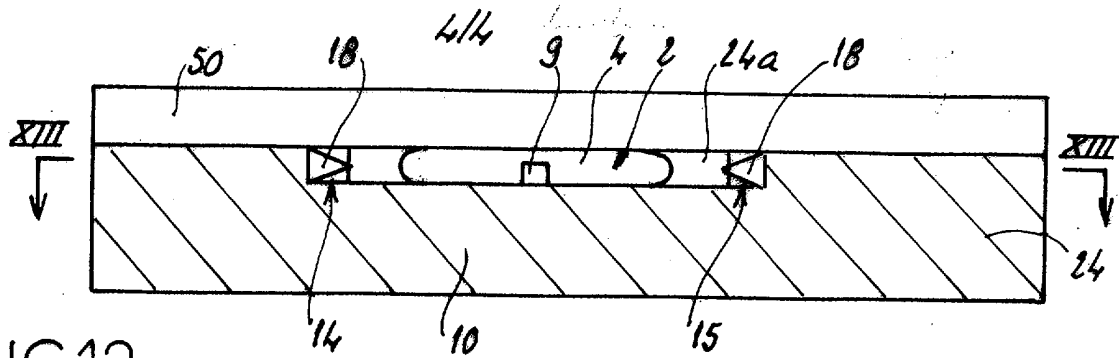


FIG 12

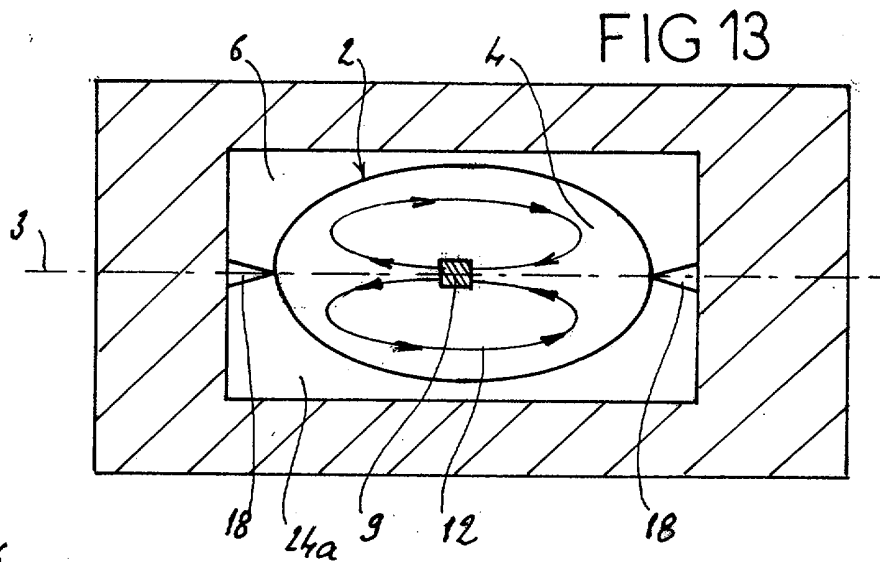


FIG 13

FIG 14

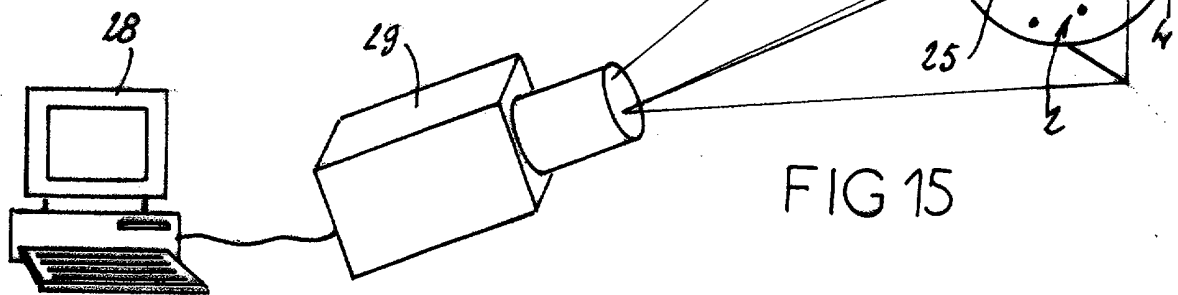
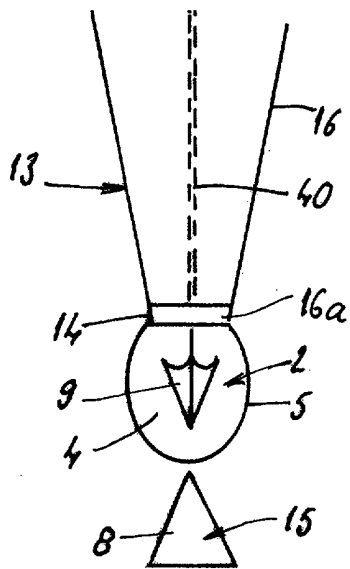


FIG 15

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement
national

FA 611933
FR 0111883

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	WO 99 62622 A (IND RES LTD ;ARNOLD WILLIAM MICHAEL (NZ)) 9 décembre 1999 (1999-12-09) * abrégé; figures 1-3 * * page 5, ligne 15 - page 8, ligne 30 * ----	1-29	G01N1/40 G01N33/543 B01J19/00
A	US 5 658 723 A (OBERHARDT BRUCE) 19 août 1997 (1997-08-19) * abrégé; figures 31-34 * * colonne 23, ligne 6 - colonne 24, ligne 17 * ----	1-29	
A	WO 99 54730 A (LEHTO ARI ;LOEVGREN TIMO (FI); WALLAC OY (FI); KOJOLA HANNU (FI);) 28 octobre 1999 (1999-10-28) * abrégé; revendications 1,14-18; figures 1,2,21,22 * * page 4, ligne 13 - page 5, ligne 5 * * page 17, ligne 22 - page 18, ligne 17 * ----	1-29	
A	EP 0 364 203 A (PHYBER HOLDINGS LIMITED) 18 avril 1990 (1990-04-18) * abrégé; figures 1-3 * ----	1,15-29	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	LIU H ET AL: "ANALYTICAL CHEMISTRY IN A DROP. SOLVENT EXTRACTION IN A MICRODROP" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, vol. 68, no. 11, 1 juin 1996 (1996-06-01), pages 1817-1821, XP000594175 ISSN: 0003-2700 * le document en entier * -----	1,15	B01L G01N B01J
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
12 avril 2002		Runser, 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			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0111883 FA 611933

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 12-04-2002
 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 9962622 A	09-12-1999	AU 4296899 A	20-12-1999
		DE 19983263 T0	31-05-2001
		GB 2356162 A , B	16-05-2001
		WO 9962622 A1	09-12-1999
US 5658723 A	19-08-1997	US 4849340 A	18-07-1989
		US 6197494 B1	06-03-2001
		AT 120543 T	15-04-1995
		AU 613623 B2	08-08-1991
		AU 1591888 A	02-11-1988
		CA 1310566 A1	24-11-1992
		DE 3853457 D1	04-05-1995
		DE 3853457 T2	26-10-1995
		EP 0308494 A1	29-03-1989
		JP 1502797 T	28-09-1989
		JP 2736091 B2	02-04-1998
		WO 8807666 A1	06-10-1988
		US 5110727 A	05-05-1992
WO 9954730 A	28-10-1999	FI 980874 A	21-10-1999
		AU 3423499 A	08-11-1999
		WO 9954730 A1	28-10-1999
EP 0364203 A	18-04-1990	EP 0364203 A1	18-04-1990
		JP 2257034 A	17-10-1990