



DEMANDE DE BREVET EUROPEEN


 Numéro de dépôt: 88401903.5


 Int. Cl.⁴: **A 61 D 7/02**


 Date de dépôt: 22.07.88


 Priorité: 13.11.87 FR 8715741
 22.07.87 FR 8710359


 Date de publication de la demande:
 22.02.89 Bulletin 89/08


 Etats contractants désignés:
 DE ES FR GB IT NL


 Demandeur: Cassou, Robert
 "Les Camus" Sainte Montaine
 F-18700 Aubigny-sur-Nère (FR)

Cassou, Maurice
 10, rue Georges Clémenceau
 F-61300 L'Aigle (FR)

Cassou, Bertrand
 10, rue Georges Clémenceau
 F-61300 L'Aigle (FR)


 Inventeur: Cassou, Robert
 "LES CAMUS" Sainte Montaine
 F-18700 Aubigny-sur-Nère (FR)

Henny, Joseph
 Rue du Beaujolais
 F-54500 Vandœuvre Les Nancy (FR)

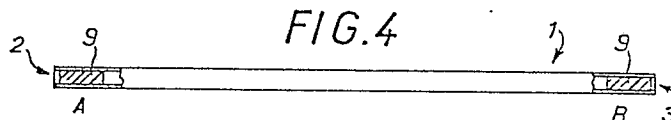
Cassou, Maurice
 10, rue Georges Clémenceau
 F-61300 L'Aigle (FR)


 Mandataire: CABINET BONNET-THIRION
 95 Boulevard Beaumarchais
 F-75003 Paris (FR)


Paillette pour le stockage de petites quantités de substances, notamment biologiques et son utilisation dans un procédé de fécondation.


 Une telle paillette se compose d'un segment (8) de tube (1) dont les deux extrémités (2,3) définissent respectivement une première et une seconde zones terminales ; la première zone terminale est équipée d'un moyen de bouchage correspondant, dit premier, la seconde zone terminale est également équipée d'un moyen de bouchage correspondant, dit second, comportant un bouchon dit ECA (9) en un élastomère compact adhérent à la paroi interne du tube (1) et obturant celui-ci d'une manière étanche même après plusieurs piqûres d'une aiguille creuse amovible.

Lorsqu'une telle paillette ne comporte pas de bouchon devenant étanche au contact d'un liquide aqueux mais que par contre le premier moyen de bouchage est constitué lui aussi par un bouchon ECA, celle-ci peut être utilisée dans un procédé de fécondation biomimétique.



Description

"Paillette pour le stockage de petites quantités de substances notamment biologiques et son utilisation dans un procédé de fécondation".

La présente invention concerne une paillette du genre de celles utilisées pour le stockage de petites quantités de substances, notamment biologiques, se composant d'un segment de tube dont les deux extrémités définissent respectivement une première et une seconde zone terminale, la première zone terminale étant équipée d'un moyen de bouchage correspondant, dit premier.

Telles que décrite pour la première fois dans le brevet FR-995878 (CASSOU), une telle paillette se présente sous la forme d'un tube fin allongé équipé, dans une desdites zones terminales, d'un bouchon tripartite comportant deux tampons d'une matière fibreuse perméable aux gaz et qui ensèrent une poudre initialement perméable elle aussi aux gaz et susceptible de se transformer au contact d'un liquide aqueux en une pâte ou gel imperméable en créant un bouchon étanche qui peut néanmoins coulisser dans le tube.

L'autre zone terminale du segment de tube demeure normalement ouverte pour l'introduction du liquide à conserver, généralement par aspiration exercée à travers le bouchon tripartite.

Pour mettre le liquide chargé dans le tube à l'abri de toute contamination et réciproquement, si il s'agit d'un liquide partiellement dangereux pour l'environnement, pour éviter sa diffusion hors de la paillette, la seconde zone terminale doit naturellement être obturée et l'on disposait jusqu'à maintenant de diverses possibilités :

- obturation par bouchage,
- soudage, par exemple aux ultrasons,

application de la technique décrite au brevet précité consistant à tremper l'extrémité à obturer dans une poudre semblable à celle utilisée dans le bouchon tripartite.

La demande de brevet DE-A-2 506 108 (POPOVIC) décrit une paillette bouchée à l'une de ses deux zones terminales par un autre bouchon tripartite initialement imperméable au gaz mais pouvant former un piston étanche.

Ce bouchon tripartite comporte à la place des tampons en une matière fibreuse perméable en gaz du bouchon CASSOU, des tampons en une mousse de polystyrène imperméable au gaz, enserrant une poudre analogue à celle du bouchon CASSOU les liquides sont introduits dans cette paillette par translation du bouchon tripartite d'une extrémité vers l'autre.

Comme dans le brevet français ci-dessus, après remplissage il convient d'obturer la seconde zone terminale de la paillette.

Lesdits tampons de mousse de polystyrène ont le grave inconvénient de diminuer considérablement de volume à la température de l'azote liquide et de se transformer en une couche de matériau n'obturant plus le tube. Seul le gel issu de la poudre assure alors la séparation de l'intérieur de la paillette avec l'extérieur.

En raison des besoins de plus en plus fréquents

de manipulations et de stockages d'échantillons biologiques particulièrement dangereux, le besoin est apparu d'un renforcement de la protection contre tout risque de contamination des opérateurs et de l'environnement.

La présente invention concerne la création d'une paillette offrant une haute protection contre tout risque de contamination tout en se prêtant à une manipulation simple, commode et sûre.

La présente invention a ainsi pour objet une paillette du genre de celles utilisées pour le stockage de petites quantités de substances, notamment biologiques, se composant d'un segment de tube dont les deux extrémités définissent respectivement une première et une seconde zone terminale, la première zone terminale étant équipée d'un moyen de bouchage correspondant, dit premier, caractérisé en ce que la seconde zone est également équipée d'un moyen de bouchage correspondant, dit second, comportant un bouchon en un élastomère compact, dit ci-après bouchon ECA, adhérent à la paroi interne du tube et obturant celui-ci d'une manière étanche même après plusieurs piqûres d'une aiguille creuse amovible.

Ainsi la paillette selon l'invention, lorsqu'elle est vide de toute substance, comporte déjà à ses extrémités un premier et un second moyen de bouchage. Pour introduire une substance à l'intérieur de cette paillette il convient de percer ledit bouchon ECA avec une aiguille creuse dont le conduit permet le passage de la substance choisie, celle-ci devant être suffisamment fluide pour ne pas provoquer l'obstruction dudit conduit. Le retrait de l'aiguille provoque le rebouchage, grâce à l'élasticité de l'élastomère, du canal créé par l'aiguille dans le bouchon.

Ainsi une telle paillette, peut être manipulée d'une manière automatisée et l'opération délicate du bouchage final, lorsque la paillette contient un produit dangereux, est évitée.

Un autre objet de la présente invention concerne l'utilisation d'une paillette, où le premier comme le second moyen de bouchage est constitué par un bouchon ECA, dans un procédé de fécondation in-vitro d'au moins un gamète femelle par un gamète mâle issu d'un groupe de gamètes mâles, les gamètes étant de provenance humaine ou animale.

Ce procédé consiste à former dans le segment de tube une pluralité de segments liquides jointifs respectivement adaptés à constituer de part et d'autre d'une zone intermédiaire de liaison, une zone de chargement de gamètes mâles à proximité d'une desdites zones terminales et une zone de chargement de gamètes femelles à proximité de l'autre zone terminale.

Ce procédé a l'avantage d'être biomimétique, dans la mesure où les spermatozoïdes doivent parcourir une certaine distance dans un tube de faible diamètre avant d'attendre les ovocytes pour en assurer la fécondation. Les ovocytes sont atteints

en premier par les spermatozoïdes les plus mobiles et les plus vigoureux.

Cette fécondation in-vitro est naturellement effectuée à une température appropriée variable selon les espèces concernées.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention ressortiront d'ailleurs de la description qui va suivre, à titre d'exemples, en référence aux dessins annexés sur lesquels ;

la figure 1 représente en coupe axiale partielle une paillette de l'art intérieur décrite dans le brevet FR-995 878 ;

la figure 2 représente en coupe axiale partielle une paillette de l'art antérieur décrite dans la demande de brevet DE-A-2 506 108 ;

les figures 3 à 10 représentent chaque fois en coupe axiale partielle des modes de réalisation d'une paillette selon la présente invention ;

la figure 11 représente une vue schématique d'un appareil destiné à la fabrication des paillettes représentées aux figures 7 à 10.

La paillette de la figure 1 se compose d'un segment de tube 1 cylindrique ouvert à ses deux extrémités 2, 3. Celles-ci définissent respectivement une première et une seconde zone terminale.

La première zone terminale contient, à l'intérieur du tube 1, un bouchon tripartite 4.

Ce bouchon 4 est constitué par un segment 5 d'une poudre spéciale entre deux tampons 6, 7 d'une substance fibreuse perméable au fluide qui se présente ici sous la forme d'une mèche tressée. La poudre spéciale du segment 5 initialement poreuse aux gaz a la propriété de se transformer rapidement au contact d'un liquide aqueux en une pâte ou gel imperméable adhérent à la paroi du tube et durcissant au contact de l'air, formant ainsi un bouchon hermétique aux fluides. Le tube de l'art antérieur ne présente ainsi qu'un seul bouchon. Le remplissage du segment 8 du tube 1 par un liquide aqueux ne peut avoir lieu que par l'extrémité ouvert 3 à cause de la fonction même du bouchon tripartite.

La paillette de la figure 2 comporte elle aussi un bouchon tripartite 104 dans une première zone terminale. Un segment 5 de poudre spéciale est insérée entre deux tampons 106, 107 en mousse de polystyrène. La qualité de mousse confère à ce bouchon tripartite 104 une fonction différente de celle du bouchon tripartite 4 de la figure 1.

En effet à température ambiante ce bouchon 104 est étanche au gaz et sert essentiellement de piston mobile à l'intérieur de la paillette.

A la température de l'azote liquide, les alvéoles s'effondrent sur elles-mêmes avec une réduction de volume importante des tampons 106 et 107, seule la poudre du segment 5 plus ou moins prise en masse s'interpose alors entre le contenu de la paillette et l'extérieur. Il faut remarquer de plus que le polystyrène n'est pas un élastomère.

La figure 3 représente une paillette selon l'invention qui par rapport à la paillette de l'art antérieur comporte en plus vers le bord de la seconde extrémité 3 du tube 1, à l'intérieur, un bouchon 9 en élastomère compact. Ce bouchon a une longueur limitée à une faible fraction de la longueur totale du tube par exemple d'un vingtième de celle-ci.

Ce bouchon 9, dit bouchon ECA, est constitué d'un élastomère compact qui adhère à la paroi intérieure du tube et qui a la propriété de se laisser traverser de part en part par une aiguille creuse d'injection en créant une sorte de canal qui enserre le corps de l'aiguille d'une manière étanche. Ce perçage momentané permet de faire communiquer l'intérieur du tube 1 avec l'extérieur via le bouchon 9 en élastomère compact, et donc d'opérer des transferts de matière via le conduit de l'aiguille entre l'intérieur du tube et l'extérieur. Lorsque ces transferts sont terminés l'aiguille creuse est retirée et l'élastomère compact est suffisamment élastique pour que le canal de passage de l'aiguille se referme hermétiquement. Avantageusement l'élastomère compact aura une dureté finale Shore A comprise entre 20 et 50.

Par élastomère compact, on entend un élastomère sans alvéole, de façon à éviter l'effondrement et le rapetissement du bouchon aux températures de cryoconservation.

L'élastomère compact peut être un caoutchouc thermoplastique choisi parmi les cariflex TR (marque déposée de la Société Shell) le Solprene (marque déposée de la Société Philips). L'Europrene Sol T (marque déposée de la Société Anic) ou un élastomère à un ou deux composants, vulcanisable à température ambiante comme le mastic silicone translucide Rhodorsil (marque déposée de la Société Rhône-Poulenc), le Silopren (marque déposée de la Société Bayer), le Silicone Coulable (marque déposée de la Société Rezolin) ou le Silbione RTV (Rhône-Poulenc) à bi-composant.

Les élastomères sont choisis non-cytotoxiques et sans propriété de relargage ni d'absorption à l'égard du milieu biologique introduit dans le tube.

Le bouchon 9 en élastomère compact peut être mis en place à l'intérieur du tube par bouchage classique, à l'aide d'un bouchon préformé, par enfoncement à force à l'intérieur du tube 1. Le tube est maintenu pendant cette opération dans un canon de soutien qui l'enserme étroitement pour éviter toute déformation ou flambage.

Un autre procédé préféré consiste à injecter à l'intérieur du tube vers son extrémité 3 une quantité dosée d'un élastomère thermoplastique ou se vulcanisant à froid.

La figure 4 montre une paillette où le premier comme le deuxième moyen de bouchage est constitué par un bouchon ECA 9 voisin du bord de l'extrémité correspondante du tube 1.

A la différence des paillettes qui comportent un bouchon tripartite, il est possible de remplir cette paillette d'un ou plusieurs liquides par l'une ou l'autre de ses extrémités 2 ou 3.

La figure 5 représente une paillette selon l'invention qui comporte au voisinage immédiat du bouchon ECA 9 du côté vers l'intérieur du tube, un étranglement circulaire 11 du tube et de l'autre côté un ourlet 12 globalement circulaire situé à l'extrémité du tube; ces restrictions de diamètre du tube ont pour fonction de parfaire le maintien longitudinal du bouchon 9, tout en permettant le passage des aiguilles creuses.

L'étranglement 11 est produit par l'action d'un

conformateur à molette et l'ourlet 12 par déformation à chaud de l'extrémité du tube au moyen d'un conformateur rotatif.

Une forme de réalisation non représentée, variante de la réalisation de la figure 5 est constituée par un tube 1 où le bouchon ECA 9 est disposé plus à l'intérieur du tube entre deux étranglements analogues à celui 11 de la figure 5. Il n'est pas alors utile de prévoir un ourlet 12 et la partie du tube adjacente à l'extrémité 3 peut recevoir un bouchon dur, amovible de surprotection.

Dans d'autres formes de réalisations non représentées variantes de la réalisation de la figure 5 l'étranglement 11 est absent, mais l'ourlet 12 reste présent. De même l'étranglement 11 peut être présent avec l'ourlet 12 absent.

La figure 6 représente une paillette selon l'invention où le bouchon 4 tripartite a été déplacé vers l'intérieur du tube à la fabrication pour ménager la place nécessaire pour enfoncer, après remplissage du tube par la substance à conserver, un bouchon amovible 13 en un matériau rigide. La partie cylindrique 14 de ce bouchon 13 qui dépasse la paillette a avantageusement un diamètre égal à celui extérieur du tube pour ne pas augmenter l'encombrement radial de la paillette au stockage.

Le matériau rigide peut être notamment en PVC ou en polyamide.

La figure 7 représente une paillette selon l'invention où le premier moyen de bouchage comporte un bouchon tripartite 4 et où a été installée par perforation du deuxième bouchon ECA 9, à la fabrication en usine, une aiguille creuse 15 à pointe biseautée et équipée à l'extérieur du tube d'un embout tronconique mâle 16 adapté à se raccorder à un cône Luer femelle d'une aiguille d'injection classique.

Le tronc de cône 16 est pourvu d'une garde 17 destinée à faciliter l'extraction ultérieure de l'aiguille du bouchon 9 et également à solidariser et à désolidariser le raccord mâle-femelle du tronc de cône 16 avec une aiguille d'injection classique. Une pince spéciale peut être prévue pour réaliser ces opérations. La garde 17 n'est cependant pas indispensable. La pointe biseautée de l'aiguille 15 dépasse à l'intérieur du tube le bouchon d'une certaine longueur. Ce dépassement est prévu en cas d'injection de liquide par l'aiguille 15 pour obtenir la création d'une bulle de gaz dont la longueur sera d'autant plus importante que la pointe de l'aiguille 15 s'avance à l'intérieur du tube. En effet, lors d'un chargement du tube par un liquide, l'aspiration par l'extrémité 2 du tube crée une sorte de piston de liquide qui va en grossissant et qui se déplace vers le bouchon tripartite jusqu'à atteindre la poudre du segment 5, ce qui arrête par colmatage l'aspiration. Il reste ainsi une bulle de gaz située entre la pointe biseautée de l'aiguille et le bouchon 9. Le gaz est normalement de l'air, mais peut être un autre gaz inerte si le tube a été rempli d'un autre gaz.

La paillette équipée de l'aiguille 15 selon la figure 5 peut être également réalisée par l'utilisateur au moment où il en a besoin à partir d'une paillette équipée d'un bouchon 9 par perforation manuelle ou en se servant d'un outil aidant la pénétration axiale

de l'aiguille 15 livrée séparément.

La figure 8 représente une paillette où l'aiguille 15 précédente de la figure 7 a été remplacée par une aiguille classique 18. Un bicon "double mâle Luer" non représenté permet de relier cette aiguille creuse classique à une autre aiguille creuse classique.

La figure 9 représente une paillette où le premier moyen de bouchage comporte un bouchon ECA 19 ainsi qu'un bouchon tripartite 4 et le second moyen de bouchage un bouchon ECA 9 équipé d'une aiguille 15 à embout mâle.

Ce mode de réalisation de la paillette ne comporte qu'un ourlet 20 aux extrémités 2 et 3, mais il est possible de prévoir un étranglement comme celui 11 de la figure 5. Le bouchon tripartite 4 a été déplacé à la fabrication vers l'intérieur du tube pour laisser la place au bouchon 19. Un espace 21 rempli de gaz notamment d'air existe entre le bouchon 19 et le bouchon tripartite 4. Cet espace est ménagé pour permettre d'y faire déboucher la pointe biseautée d'une aiguille ayant traversé de part en part le bouchon 19. Cet espace 21 n'est pas cependant en général indispensable.

La figure 10 représente une forme de réalisation de la paillette de la figure 9 où ont été installées en usine une aiguille classique 22 qui traverse le bouchon 19 et une aiguille 23 à embout mâle en tronc de cône sans garde qui traverse le bouchon 9.

La figure 11 représente d'une manière schématique un appareil destiné à la mise en place automatique de l'aiguille creuse à embout mâle 15 ou 23 dans une paillette selon l'invention avec guidage selon l'axe du tube 1.

L'appareil se compose d'une partie 24 qui maintient dans une gouttière le tube 1 et d'une partie 25 qui maintient l'aiguille 15 selon l'axe du tube. Une translation de 25 se rapprochant de 24 a enfoncé l'aiguille 15 dans la position désirée.

On a décrit ainsi quelques formes de réalisations possibles. Il est bien entendu que ces formes de réalisation peuvent se combiner entre elles pour donner des réalisations qui n'ont pas été représentées, mais qui font partie intégrante de l'invention.

Ainsi par exemple la forme de réalisation de la partie à droite de la paillette de la figure 5 comportant un bouchon 9 en élastomère, un étranglement circulaire 11 et un ourlet 12 peut se retrouver à gauche de la paillette de la figure 9 à la place de l'ourlet 20 et du bouchon 19. De même d'une manière générale les aiguilles peuvent être à cône Luer mâle ou femelle.

Il est également possible d'utiliser toutes sortes d'aiguilles creuses possédant une ou deux pointes, avec garde ou sans garde, avec cône ou sans cône installées en usine ou livrées séparément.

Toutes ces paillettes précédentes sont placées pour la vente dans des conditions stériles sous emballages individuels étanches en atmosphère stérile.

Une paillette équipée comme à la figure 9 d'un bouchon élastomère 19 non équipé d'une aiguille et d'un bouchon ECA 9 non équipé d'une aiguille comme à la figure 3 permet la fabrication en usine d'une paillette qui contient entre ses deux bouchons ECA 9, 19 une atmosphère inerte que l'on peut

choisir notamment parmi l'air, le gaz carbonique, l'azote, les gaz rares, ou même un milieu de culture confiné entre deux bulles de gaz.

Le fonctionnement général des paillettes selon l'invention sera maintenant décrit.

S'il y a d'un côté de la paillette un bouchon tripartite 4 il est possible de faire arriver des gaz notamment air, CO₂, N₂, gaz rares tant que la poudre du segment 5 n'a pas réagi avec un liquide ou de l'eau. Ce gaz peut pénétrer à l'intérieur du tube si l'obturation du tube a été momentanément levée par la présence d'une aiguille équipant l'autre extrémité 3 de la paillette et traversant un bouchon ECA. L'introduction d'un liquide aqueux par l'extrémité 2 a pour effet d'obturer le bouchon tripartite. Il est possible également d'aspirer le contenu gazeux du tube au travers du bouchon tripartite 4 non transformé si l'obturation de l'autre côté est momentanément levée.

Du côté de l'extrémité 3 il est possible d'introduire ou de recueillir gaz et liquides variés d'une manière séquentielle.

Si la paillette comme celle de la figure 4 ne comporte pas de bouchon tripartite 4 ou 104, il est possible d'injecter ou de retirer un quelconque fluide par l'une ou l'autre des extrémités 2, 3 du tube 1 à condition que les deux bouchons ECA 9 soient percés chacun par une aiguille creuse.

L'arrachement des aiguilles de leur bouchon ECA recrée une étanchéité qui peut être encore protégée à l'aide de bouchons durs comme celui 13 décrit à la figure 6. Les aiguilles sont d'un emploi unique et jetées après utilisation dans des conditions définies d'après les risques de contamination et de toxicité.

Ainsi les paillettes selon l'invention permettent le stockage en paillette de doses de toute substance non agressives chimiquement pour les composants du tube, sous forme initialement liquide, gazeuse, ou particulaire. Les particules doivent être suffisamment fines pour pouvoir s'écouler à travers le canal d'une aiguille.

Ces paillettes conviennent parfaitement au stockage et conservation par cryogénie de liquides biologiques, cellules, gamètes animaux ou végétaux, microbes, virus.

Comme dans les paillettes de l'art antérieur il est possible de recueillir le contenu de la paillette en coupant le tube par un outil tranchant d'une manière perpendiculaire à l'axe dans une zone du tube voisine, mais non en vis-à-vis du bouchon obturant l'extrémité 3 du tube. Mais pour les produits toxiques ou dangereux il est préférable de couper le tube et le bouchon ECA 9 en élastomère simultanément de façon à laisser un reste de bouchon sous forme d'un opercule plus ou moins mince. Si le tube comporte un bouchon 19 en élastomère bouchant la première extrémité 2 du tube il est possible de couper le tube dans l'espace 21 compris entre le bouchon 19 en élastomère et le bouchon tripartite 4. Le bouchon tripartite peut alors être poussé par une tige ce qui provoque l'éjection dudit opercule et la sortie du contenu de la paillette. On peut par exemple utiliser un pistolet classique d'insémination comme celui décrit notamment dans le brevet français 1 224 918.

Une autre façon de recueillir, dans de bonnes conditions d'asepsie et de protection de l'utilisateur, le contenu du tube consiste à retranspercer le bouchon ECA 9 de la seconde extrémité 3 par une aiguille en la faisant dépasser cette fois très peu du bouchon en direction de l'intérieur du tube, de brancher cette aiguille par un conduit à un réceptacle, puis d'utiliser le bouchon tripartite comme un piston comme cela est décrit ci-dessus.

Ces nouvelles paillettes permettent la manipulation et la conservation de petites doses de produits chimiquement ou biologiquement dangereux dans des conditions de protection très améliorées.

D'une manière réciproque ces nouvelles paillettes permettant la manipulation et la conservation de substances diverses, notamment biologiques dans des conditions d'asepsie améliorées.

Comme les paillettes de l'art antérieur les paillettes selon l'invention supportent de brutales transitions dans les deux sens entre -196°C et environ 34°C. Tous les composants de la paillette sont par ailleurs choisis pour pouvoir supporter la stérilisation notamment par irradiation.

Les paillettes étant avantageusement réalisées, de manière déjà connue, dans un matériau de qualité cristal d'épaisseur de paroi d'environ 10/100 mm, leur transparence optique est telle qu'il est possible de regarder avec une loupe binoculaire ce qui se passe à l'intérieur de la paillette, en particulier dans le cas de gamètes, d'observer les premiers stades de développement d'embryons.

Exemple de fécondation de gamètes humains à l'aide de la paillette de la figure 4 :

On prend une paillette, en butadiène styrène ou en méthacrylate de méthyle de qualité cristal, d'une longueur de 133mm et d'un diamètre interne de 2 mm, obturée à ses deux extrémités par des bouchons ECA, et qui a été au préalable stérilisée par irradiation aux rayons gamma.

Un des bouchons, soit A, est percé par une aiguille creuse biseautée qui sert d'orifice d'échappement, la pointe de l'aiguille sortant à peine du bouchon.

L'autre bouchon, soit B, est percé par une aiguille montée en bout d'une seringue et remplie sans air d'un liquide milieu de culture, comme par exemple le milieu B₂ de Menezo.

On remplit alors tout l'intérieur du tube du liquide rose de Menezo, sans présence d'une phase gazeuse, car la pointe de l'aiguille d'injection de ce milieu sort à peine du bouchon B.

L'aiguille d'injection est retirée du bouchon B.

A l'aide d'une autre aiguille en bout d'une autre seringue remplie sans air d'un milieu dilueur par exemple milieu F₁ ou Tris contenant des spermatozoïdes, on pique de nouveau le bouchon B en faisant dépasser cette fois l'aiguille d'environ 15mm, et on injecte un segment du milieu dilueur d'environ 10mm de longueur ; ceci provoque la sortie par l'aiguille d'échappement du bouchon A d'un volume correspondant du milieu de Menezo.

Toutes les aiguilles sont enlevées.

On reperce alors le bouchon B à l'aide d'une

aiguille creuse biseautée dont la pointe dépasse à peine le bouchon.

Avec une aiguille et une seringue de petite capacité, on injecte par le bouchon a quelques gouttes d'un dilueur contenant un ou plusieurs ovocytes. L'excès de liquide s'échappe par l'aiguille creuse du bouchon B. Cette introduction d'ovocyte(s) dans le tube peut être contrôlée par examen à la loupe binoculaire.

Toutes les aiguilles sont enlevées.

Le tube ainsi rempli est maintenu horizontal à une température voisine de 37°C, et le clivage des ovocytes est contrôlé par examen visuel. Lorsque les embryons atteignent le stade de division 4 ou 8, on les recueille dans une boîte de Petri en coupant le tube par un outil tranchant d'une manière perpendiculaire à l'axe du tube, soit dans une zone située en dehors du bouchon voisin des embryons, soit dans une zone en regard du bouchon.

Chaque embryon recueilli peut être directement implanté chez une femme receveuse, ou congelé pour conservation dans une paillette française dans un milieu contenant un cryoprotecteur, comme le glycérol, l'éthylène glycol ou le propylène glycol. Pour ce faire l'embryon peut être transféré dans une paillette, selon la présente invention, à l'aide d'aiguilles creuses amovibles. On place l'embryon dans son milieu nourricier contenant le cryoprotecteur et l'on s'arrange, par des injections successives, pour que l'embryon se retrouve à l'intérieur du tube dans son milieu sous la forme d'un segment de liquide entouré de chaque côté d'une bulle d'air. Les bulles d'air jouent le rôle d'amortisseurs lors des changements de volumes entraînés par les transitions de phase liquide-solide et solide-liquide lors de la congélation et de la décongélation. De plus ces bulles d'air servent de séparateur entre différents segments de liquide différents que l'on ne désire pas mélanger au départ.

Il est ainsi possible de prévoir à côté du milieu nourricier contenant l'embryon et le cryoprotecteur, un autre milieu liquide dit de décongélation, ces deux milieux étant dans le tube séparés par une bulle d'air. La paillette est ensuite congelée pour conservation. A la décongélation, les différents milieux repassant à l'état liquide peuvent être mélangés en secouant la paillette de façon à ramener les bulles d'air à une extrémité de la paillette, le milieu de décongélation produisant son effet sur l'embryon avant le transfert de celui-ci.

Revendications

1. Paillettes pour le stockage de petites quantités de substances, notamment biologiques, du genre se composant d'un segment (8) de tube (1) dont les deux extrémités (2, 3) définissent respectivement une première et une seconde zone terminale, la première zone terminale étant équipée d'un moyen de bouchage correspondant dit premier, caractérisé en ce que la seconde zone est également

équipée d'un moyen de bouchage correspondant, dit second, qui comporte un bouchon, dit ECA (9, 19) en un élastomère compact adhérent à la paroi interne du tube (1) et obturant celui-ci d'une manière étanche même après plusieurs piqûres d'une aiguille creuse amovible.

2. Paillette selon la revendication 1, caractérisée en ce que le premier moyen de bouchage comporte un bouchon ECA (9, 19).

3. Paillette selon la revendication 2, caractérisée en ce que le premier comme le second moyen de bouchage est constitué par un bouchon ECA (9).

4. Paillette selon la revendication 1, caractérisée en ce que le premier moyen de bouchage comporte un bouchon tripartite connu en soit et constitué par deux tampons (6,7) d'une substance fibreuse enserrant un segment (5) d'une poudre susceptible de se prendre en masse au contact d'un liquide aqueux.

5. Paillette selon la revendication 4, caractérisée en ce que le premier moyen de bouchage comporte en outre à une certaine distance du bouchon tripartite et vers la première extrémité (2) un bouchon ECA (19).

6. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que au moins un bouchon ECA (9, 19) est voisin du bord de l'extrémité du tube.

7. Paillette selon la revendication 6, caractérisée en ce que le tube (1) comporte, au voisinage d'un bouchon ECA, un ourlet (12,20) de restriction du diamètre du tube.

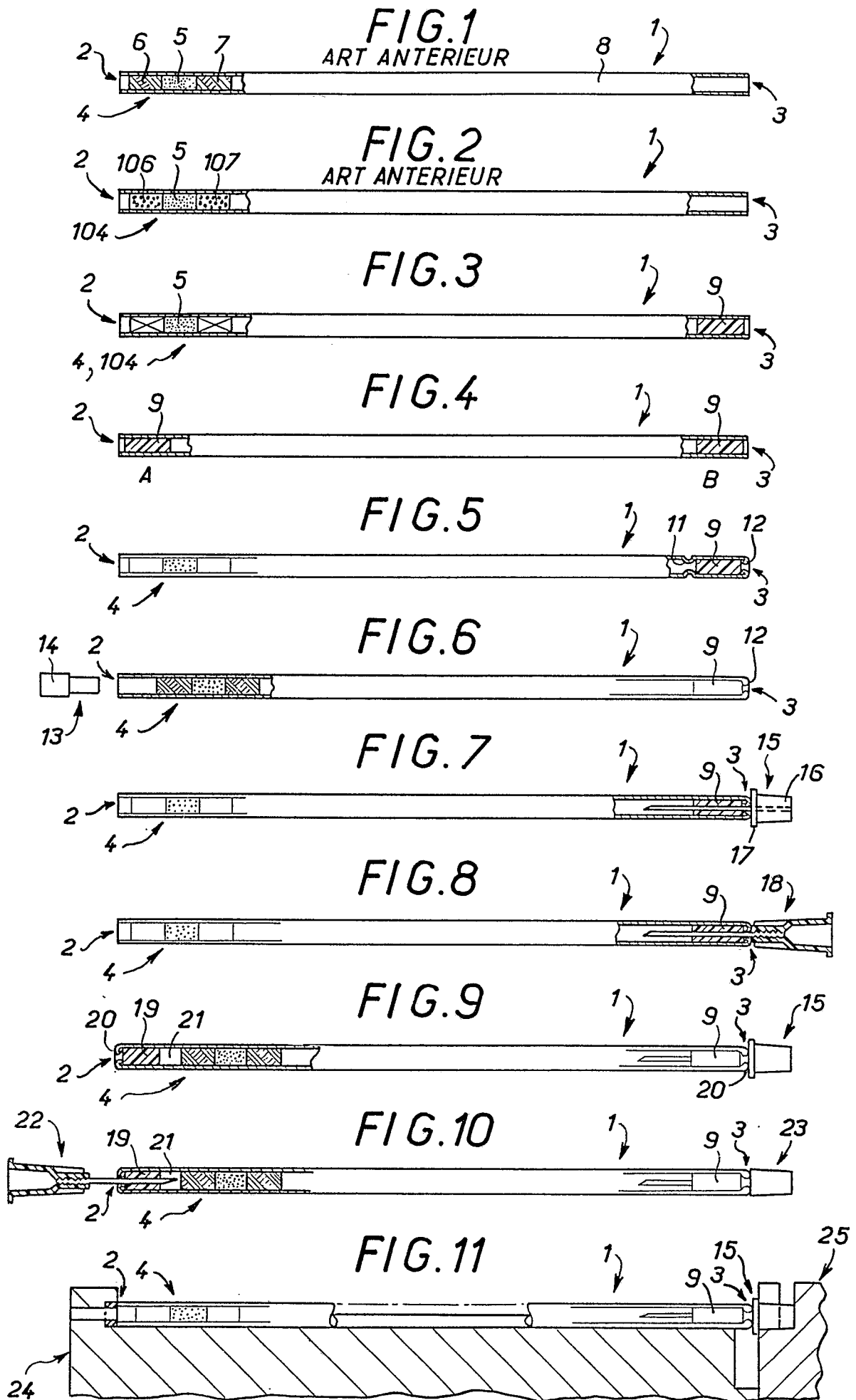
8. Paillette selon la revendication 6 ou 7, caractérisée en ce que le tube comporte au voisinage immédiat d'un bouchon ECA (9, 19) un étranglement circulaire (11).

9. Paillette selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que chaque bouchon ECA (9, 19) est équipé d'une aiguille creuse (15, 18, 22, 23) le traversant, l'embout de l'aiguille étant à l'extérieur du tube.

10. Paillette selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'élastomère compact est choisi d'une dureté finale Shore A comprise entre 20 et 50.

11. Paillette selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'élastomère est choisi dans le groupe constitué par les caoutchoucs thermoplastiques et les élastomères vulcanisables à température ambiante.

12. Utilisation d'une paillette selon la revendication 3 dans un procédé de fécondation biomimétique dans lequel on forme dans le segment de tube une pluralité de segments liquides jointifs respectivement adaptés à constituer de part et d'autre d'une zone intermédiaire de liaison, une zone de chargement de gamètes mâles à proximité d'une desdites zones terminales et une zone de chargement de gamètes femelles à proximité de l'autre zone terminale.





DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Y	DE-A-2 194 453 (R.R. ALTER) * Page 2, lignes 20-34; figure 2 * ---	1-3,6	A 61 D 7/02
Y	GB-A-2 033 230 (BAXTER TRAVENOL) * Page 2, lignes 106-114; figure 4 * ---	1-3,6	
A,D	DE-A-2 506 108 (POPOVIC) * Page 5, lignes 1-17; figures 1-6 * ---	4,5	
A	EP-A-0 148 473 (REHAU PLASTIKS AG) * Page 6, lignes 7-18; figure 2 * ---	7,8	
A	CH-A- 533 542 (GENECO INC. PANAMA) * Colonne 1, lignes 61-64 * ---	9,12	
A,D	FR-A-1 224 918 (CASSOU) ---		
A,D	FR-A- 995 878 (CASSOU) -----		
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
			A 61 D
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 18-10-1988	Examineur EHRSAM F.J.A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			