



(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 3 791 957 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:
17.03.2021 Bulletin 2021/11

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

(21) Numéro de dépôt: **20195121.7**

(22) Date de dépôt: **08.09.2020**

(84) Etats contractants désignés:
**AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
PL PT RO RS SE SI SK SM TR**
 Etats d'extension désignés:
BA ME
 Etats de validation désignés:
KH MA MD TN

(30) Priorité: **11.09.2019 FR 1910013**

(71) Demandeur: **Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives
75015 Paris (FR)**

(72) Inventeurs:

- **DEN DULK, Remco**
38054 GRENOBLE cedex 09 (FR)
- **ALESSIO, Manuel**
38054 GRENOBLE cedex 09 (FR)
- **CUBIZOLLES, Myriam-Laure**
38054 GRENOBLE Cedex 09 (FR)
- **GILQUIN, Benoît**
38054 GRENOBLE cedex 09 (FR)
- **REVOL-CAVALIER, Frédéric**
38054 GRENOBLE Cedex 09 (FR)

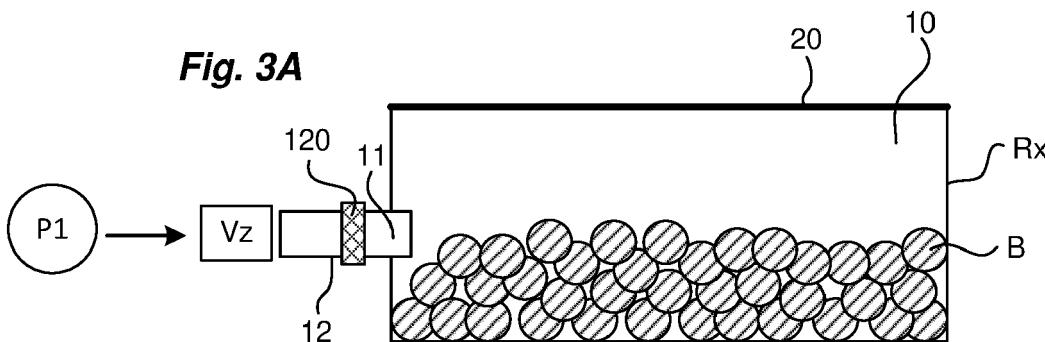
(74) Mandataire: **INNOV-GROUP
310, avenue Berthelot
69372 Lyon Cedex 08 (FR)**

(54) DISPOSITIF MICRO-FLUIDIQUE ET CARTE MICROFLUIDIQUE INCLUANT LEDIT DISPOSITIF

(57) L'invention concerne notamment un dispositif micro-fluidique comprenant un élément-support rigide et un réservoir à volume modulable réalisé dans ledit support, ledit réservoir (Rx) comportant :
 - Une cavité (10) réalisée dans ledit support, ladite cavité comportant au moins une ouverture débouchant sur une surface dudit support,

- Au moins un orifice (11) débouchant à l'intérieur de ladite cavité,
- Une première membrane (20) souple agencée pour refermer ladite ouverture,
- Une surface développée fonctionnalisée(B), formée d'un réactif ou enduite d'un réactif, placées dans ladite cavité du réservoir à volume modulable.

Fig. 3A



Description**Domaine technique de l'invention**

[0001] La présente invention se rapporte à un dispositif micro-fluidique et à une carte micro-fluidique incluant ledit dispositif.

Etat de la technique

[0002] L'analyse protéomique basée sur la spectrométrie de masse pour détecter et doser des protéines dans des échantillons biologiques comme le plasma est de plus en plus répandue car particulièrement performante. Cependant, pour que cette analyse soit optimale et fiable, elle nécessite que l'échantillon sanguin analysé soit parfaitement stable. Or il s'avère par exemple que la durée qui s'écoule entre la collecte d'un échantillon sanguin, sa préparation (pour l'obtention de la fraction sérique ou plasmatique) et son transfert vers un laboratoire d'analyse est très variable, donnant ainsi des résultats d'analyse de qualités diverses. En effet, le processus naturel de dégradation des protéines d'intérêt présentes dans le plasma peut être plus ou moins avancé selon la durée qui s'écoule entre la collecte de l'échantillon et son transfert vers le laboratoire d'analyse, ce qui entraîne une certaine variabilité dans les résultats obtenus.

[0003] La demande de brevet référencée EP3433609A1 décrit un dispositif de préparation d'un échantillon sanguin qui comporte une carte micro-fluidique à plusieurs chambres reliées entre elles. Chaque chambre est destinée à la réalisation d'une étape distincte du processus de préparation de l'échantillon sanguin.

[0004] Différents dispositifs micro-fluidiques ont également été décrits dans les brevets US 8,222,023, US 8,703,476 et la demande US2013/130262A1.

[0005] Pour mettre en œuvre le processus de préparation sur une même carte micro-fluidique de taille standard (par exemple la taille d'une carte de crédit), l'architecture du circuit fluidique doit être optimisée pour :

- Minimiser le nombre d'éléments présents dans le circuit fluidique, notamment les vannes, les pompes, les canaux fluidiques de liaison et obtenir une architecture à la fois simple et compacte, rendant la solution particulièrement robuste ;
- Mettre en œuvre toutes les étapes de préparation de la manière la plus efficace et la plus qualitative possible ;

[0006] L'un des buts de l'invention est de proposer une carte micro-fluidique destinée à mettre en œuvre les différentes étapes de préparation d'un échantillon sanguin et pouvant répondre aux exigences listées ci-dessus. La carte s'appuie notamment sur un dispositif micro-fluidique particulier faisant également l'objet d'une invention.

Exposé de l'invention

[0007] L'invention concerne ainsi un dispositif micro-fluidique tel que défini dans la revendication 1.

[0008] Des particularités de ce dispositif sont présentées dans les revendications dépendantes 2 à 6.

[0009] L'invention concerne également une carte micro-fluidique telle que définie dans la revendication 7.

[0010] Des particularités de cette carte micro-fluidique sont décrites dans les revendications 8 à 12.

[0011] L'invention concerne un système de préparation d'un échantillon sanguin tel que défini dans la revendication 13.

Brève description des figures

[0012] D'autres caractéristiques et avantages vont apparaître dans la description détaillée qui suit faite en regard des dessins annexés dans lesquels :

- La figure 1 représente la carte micro-fluidique conforme à l'invention, incluant les différents modules nécessaires à la préparation de l'échantillon sanguin ;
- La figure 2 illustre le principe de fonctionnement d'une pompe employée dans la carte micro-fluidique de l'invention ;
- Les figures 3A à 3D représentent, dans trois états de fonctionnement distincts, le dispositif micro-fluidique employé dans la carte micro-fluidique de préparation d'un échantillon sanguin.
- Les figures 4A à 4D représentent quatre architectures distinctes de la carte micro-fluidique, conformes à l'invention.
- Les figures 5A à 5M illustrent les différentes étapes de préparation de l'échantillon sanguin mises en œuvre dans la carte micro-fluidique conforme à l'invention.

Description détaillée d'au moins un mode de réalisation

[0013] Dans la suite de la description, les termes :

- "amont" et "aval" sont à considérer en tenant compte du sens de déplacement du fluide dans le système ;

[0014] L'invention vise à réaliser une carte micro-fluidique destinée à la préparation d'un échantillon sanguin.

[0015] La préparation est réalisée à partir d'un échantillon plasmatique issu de l'échantillon sanguin prélevé sur le patient.

[0016] La carte micro-fluidique C comporte un circuit fluidique comprenant des canaux, plusieurs réservoirs contribuant chacun à la préparation de l'échantillon sanguin avant analyse et divers éléments fluidiques de commande pour assurer le déplacement des fluides dans le circuit.

[0016] En référence à la figure 1, la carte micro-fluidique C peut se présenter sous la forme d'un consommable faisant partie d'un système plus global de préparation d'un échantillon sanguin. Ce système comporte ainsi :

- La carte micro-fluidique C, conforme à l'invention ;
- Un système d'actionnement de type pneumatique SP permettant d'actionner des éléments à commande pneumatique présents sur la carte ;
- Une unité de traitement et de commande configurée pour exécuter une séquence de commande de différents points de commande pneumatique du système d'actionnement pneumatique, en vue de mettre en œuvre les différentes étapes de préparation ; cette unité de traitement et de commande peut comporter un automate programmable A doté d'un microcontrôleur et d'entrées/sorties connectées au système d'actionnement pneumatique ;

[0017] La carte micro-fluidique C est réalisée selon un format standard (par exemple le format d'une carte de crédit) et permet de mener toutes les étapes de préparation de l'échantillon sanguin.

[0018] La carte micro-fluidique C est par exemple placée dans un logement adapté du système. L'automate programmable exécute des modules logiciels destinés chacun à commander une ou plusieurs des étapes de préparation. Ces modules logiciels sont exécutés pour générer des commandes de sortie à destination de différents actionneurs.

[0019] La carte micro-fluidique C comporte un support composé de plusieurs couches superposées, et notamment deux couches principales C1, C2. Les deux couches principales de la carte C peuvent notamment être réunies en une seule plaque en matériau transparent de type PMMA, polycarbonate ou COC (pour "Cyclic Olefin Copolymer"). La carte présente ainsi deux faces réalisées dans deux plans parallèles. La carte C peut également comporter une ou plusieurs autres couches intercalées entre les deux couches principales, composées chacune d'une membrane déformable réalisée dans un matériau hyper-élastique. Ces couches intermédiaires peuvent s'étendre sur toute la surface de la carte ou uniquement sur une partie de la surface de la carte. Ce type d'architecture sera décrit ci-après.

[0020] L'architecture fluidique de la carte micro-fluidique se compose de plusieurs modules fluidiques destinés chacun à la réalisation d'une ou plusieurs étapes de préparation de l'échantillon sanguin. Avantageusement, la carte comporte tous les modules sur le même support. Ces modules sont notamment les suivants :

- Un module M1 d'injection ou de stockage de l'échantillon sanguin à préparer ;
- Un module M2 de séparation du plasma sanguin qui est contenu dans l'échantillon sanguin prélevé sur l'être vivant ;
- Un module M3 d'obtention d'un volume calibré de

plasma sanguin, mis en œuvre après la séparation réalisée par le module de séparation ;

- Un module M4 de déplétion des protéines majoritaires présentes dans l'échantillon plasmatique ou un module d'enrichissement des protéines minoritaires présentes dans l'échantillon plasmatique (nommé ci-après module de déplétion/enrichissement) ;
- Un module M5 de digestion des protéines ciblées ;
- Un module M6 de stockage des peptides digérés ;

[0021] La carte micro-fluidique comporte également un ensemble de pompage EP comprenant, selon la variante envisagée, une seule pompe ou au moins deux pompes, et plusieurs vannes V fluidiques agencées sur des liaisons fluidiques L reliant les différents modules entre eux. Une vanne fluidique est commandée entre deux positions, une position autorisant l'écoulement de fluide à travers la liaison fluidique et une position interdisant l'écoulement de fluide à travers la liaison fluidique.

[0022] Chaque pompe employée dans l'ensemble de pompage EP est avantageusement à actionnement pneumatique. Comme illustrée par la figure 2, une telle pompe comporte une membrane 50 déformable agencée dans une cavité de la carte et séparant la cavité en deux volumes 51, 52 étanches l'un par rapport à l'autre. Au moins deux liaisons fluidiques 53, 54 du circuit débouchent dans le premier volume 51 et une liaison pneumatique 55 débouche dans le deuxième volume 52. La membrane 50 déformable est par exemple formée d'une couche intercalée entre les deux couches C1, C2 principales de la carte.

[0023] La première liaison fluidique 53 est commandée par une première vanne fluidique Vx commandable à l'ouverture ou à la fermeture par le système d'actionnement pneumatique SP.

[0024] La deuxième liaison fluidique 54 est commandée par une deuxième vanne fluidique Vy commandable à l'ouverture ou à la fermeture par le système d'actionnement pneumatique SP.

[0025] Bien entendu, dans la solution de l'invention, les deux vannes fluidiques pourront être de type normalement fermé ou normalement ouvert, de type monostable ou bistable. On verra également que la pompe peut être connectée à plus de deux liaisons fluidiques commandées, selon la configuration envisagée.

[0026] En référence à la figure 2, le principe de fonctionnement d'une telle pompe est le suivant :

- E1 : Une pression est appliquée dans le deuxième volume 52 de la pompe pour plaquer la membrane 50 au fond de la cavité et initier le principe d'aspiration ; La vanne Vy est alors ouverte et la vanne Vx peut être ouverte ou fermée ;
- La première vanne fluidique Vx est commandée à l'ouverture et la deuxième vanne fluidique Vy est commandée à la fermeture ;
- E2 : Une dépression est appliquée dans le deuxième volume 52 pour faire remonter la membrane 50,

créant une aspiration du fluide par la première liaison fluidique 53 dans le premier volume 51 de la cavité. La dépression est avantageusement appliquée jusqu'à plaquer la membrane 50 en haut de la cavité et remplissage complet du premier volume 51 (qui correspond alors au volume complet de la cavité de la pompe) ;

- La première vanne fluidique Vx est commandée à la fermeture et la deuxième vanne fluidique Vy est commandée à l'ouverture.
- E3 : Une pression est appliquée à la membrane 50 pour pousser le fluide présent dans le premier volume 51 par la deuxième liaison fluidique 54 jusqu'à plaquer la membrane 50 au fond de la cavité et évacuer la totalité du fluide en dehors de la pompe 5 ;

[0027] La membrane 50 de la pompe peut être réalisée dans un matériau polymère bi-composant hyper-élastique par exemple un silicone de type Ecoflex (marque déposée). Son épaisseur peut être comprise entre 100 et 500 µm.

[0028] Les fonctions de chaque module M1 à M6 sont décrites ci-dessous de manière générale. Des exemples plus précis d'architectures seront décrits en liaison avec les figures 4A à 4C.

[0029] Le module M1 d'injection ou de stockage de l'échantillon sanguin peut comporter un premier réservoir R1 dans lequel l'échantillon sanguin est stocké avant de subir les différentes étapes de préparation. Il peut également s'agir d'un simple canal d'injection par lequel l'échantillon sanguin prélevé est directement injecté.

[0030] Le module M2 de séparation est destiné à effectuer une séparation entre le plasma et les cellules sanguines dans l'échantillon sanguin provenant du module M1 d'injection ou de stockage.

[0031] Ce module M2 peut être réalisé selon différentes variantes de réalisation. De manière avantageuse, il peut comporter une chambre réalisée dans la carte C et une membrane séparative séparant ladite chambre en un premier espace et un deuxième espace. L'échantillon sanguin présent dans le module d'injection ou de stockage est filtré par ladite membrane séparative. La membrane peut être réalisée dans un matériau polymère de type Vivid (marque déposée).

[0032] Le module M3 d'obtention d'un volume calibré de plasma sanguin comporte une première pompe P1 de l'ensemble de pompage EP présentant une cavité dont le volume est connu et calibré et un réservoir R3 de collecte destiné à recevoir le volume calibré de plasma sanguin. Le volume de la pompe, correspondant au volume maximal de sang qu'elle peut aspirer dans sa cavité, correspond à l'unité de base du volume calibré à obtenir. En effet, comme il est possible de faire un ou plusieurs cycles de pompage, on peut obtenir dans le réservoir de collecte un volume égal à celui de la pompe, multiplié par le nombre de cycles de pompage effectué.

[0033] Le module M4 de déplétion/enrichissement permet de réaliser respectivement une déplétion des protéi-

nes majoritaires présentes dans l'échantillon plasmatique pour les capturer ou un enrichissement des protéines cibles à analyser présentes dans cet échantillon. Il s'agira de simplifier l'échantillon sanguin du mieux possible et d'écartier certaines protéines majoritaires, telles que l'albumine, l'immunoglobuline de type A, M ou G, les protéines du complément, les protéines de la cicatrisation... Cette liste n'est pas limitative et une simplification de l'échantillon permettra si nécessaire de gagner en profondeur d'analyse. Bien entendu, il s'agira cependant de conserver une pluralité de protéines d'espèces distinctes.

[0034] Cette étape est préférentiellement mise en œuvre dans un réservoir de déplétion ou d'enrichissement intégré à la carte micro-fluidique C. L'opération de déplétion des protéines majoritaires présentes dans le plasma est par exemple réalisée en employant un support permettant la capture d'une ou de plusieurs protéines majoritaires présentes dans l'échantillon plasmatique, comme par exemple l'albumine. Comme représenté sur les figures, ce support sera par exemple des particules ou des piliers fonctionnalisés logées et maintenues dans le réservoir ou injectées via un canal adapté à l'intérieur de la chambre par une commande envoyée par l'ordinateur programmable A. Les particules ou piliers fonctionnalisés employées seront greffées avec des composants de capture des protéines majoritaires afin de les piéger dans la première chambre. Il s'agira par exemple :

- De billes ou de piliers greffés avec des anticorps ou ligands pour la capture spécifique des protéines cibles du plasma,
- De billes ou de piliers greffés avec du Cibacron Blue pour la capture de l'albumine, et/ou
- De billes ou de piliers greffés avec de la protéine A/G/L pour la capture des immunoglobulines G.

[0035] Selon une particularité de l'invention, ce réservoir est extensible en volume et présente donc un volume modulable et variable. Un tel réservoir Rx est représenté sur les figures 3A à 3D. Le réservoir Rx comporte une cavité 10 réalisée dans la carte C dans laquelle sont placées des billes fonctionnalisées, selon la définition ci-dessus. Il comporte avantageusement un unique orifice d'entrée/sortie 11 dans lequel débouche un canal fluidique 12 de la carte. Un filtre 120 peut être placé sur le canal pour éviter que les billes placées dans le réservoir ne s'échappent vers l'extérieur, tout en laissant passer les fluides. La cavité 10 comporte au moins une ouverture réalisée sur une face de la carte et une membrane 20, réalisée dans un matériau souple, dit hyper-élastique, venant recouvrir ladite ouverture et fermer la cavité 10 de manière étanche. Cette membrane 20 constitue une paroi déformable du réservoir Rx, et permet en se déformant de moduler le volume du réservoir. L'ouverture peut présenter une forme circulaire.

[0036] La membrane 20 est apte à se déformer de manière réversible entre plusieurs configurations. Elle peut s'étirer par déformation hyper-élastique vers l'extérieur de la carte C, se rétracter à l'intérieur de la cavité 10 du réservoir par dépression et/ou compression, ou être au repos. Par matériau hyper-élastique, on entend un matériau capable de présenter une surface apte à passer d'une première superficie à une deuxième superficie, la deuxième superficie étant égale à au moins 5 fois la première superficie, par exemple à 10 fois ou même à 50 fois la première superficie. Dans sa déformation vers l'extérieur, la membrane n'est pas contrainte mécaniquement. Elle peut ainsi se gonfler, jusqu'à atteindre ses limites de propriétés élastiques.

[0037] Dans les différentes configurations de la carte, le réservoir Rx est connecté sur une pompe ayant une architecture conforme à celle décrite ci-dessus en liaison avec la figure 2. Un seul canal micro-fluidique 12 joint la pompe (par exemple P1 sur les figures 3A à 3D) au réservoir Rx. L'actionnement de la pompe en pression permet d'injecter le liquide dans le réservoir Rx. Le réservoir Rx étant extensible en volume, il peut se gonfler pour accueillir une grande quantité de fluide. Il faut ainsi noter que le volume de fluide que l'on peut injecter dans le réservoir sera dépendant uniquement des caractéristiques de déformabilité élastique de sa membrane et non de caractéristiques structurelles mécaniques du support dans lequel il est intégré.

[0038] Par ailleurs, la déformation du réservoir Rx, lors du remplissage, est commandée uniquement par l'actionnement de la pompe en pression. Aucune entrée de commande (par exemple de type pneumatique) n'est prévue pour déformer le réservoir Rx lui-même. Pour vider le réservoir, une dépression est commandée et une compression mécanique du réservoir peut être effectuée.

[0039] Ce réservoir Rx présente ainsi plusieurs avantages :

- Il permet de stocker une grande quantité de fluide ;
- Il ne nécessite pas la création d'une entrée pneumatique pour être déformé, l'actionnement de la pompe auquel il est associé permettant sa déformation lors du remplissage ;
- Son volume est limité uniquement par les propriétés élastiques de sa membrane ;
- Son volume est donc plus largement extensible qu'un réservoir classique, aucune butée ou paroi (par exemple liée à la présence d'une entrée/sortie pneumatique) ne venant entraver le déploiement de sa membrane vers l'extérieur de la carte.

[0040] Les figures 3A à 3D illustrent son principe de fonctionnement. Sur la figure 3A, la membrane 20 est au repos et non sollicitée.

[0041] Sur la figure 3B, le réservoir Rx est rempli d'un fluide F par actionnement de la pompe P1, via l'orifice d'entrée/sortie 11, augmentant la pression interne à l'intérieur du réservoir. Sous l'effet de la pression, la membrane 20 du réservoir Rx se déforme vers l'extérieur, de manière réversible, formant un dôme. Une fois le réservoir rempli, une vanne d'entrée Vz agencée sur le canal 12 peut être fermée pour maintenir le fluide F en stockage dans le réservoir Rx.

[0042] Sur la figure 3C, l'ouverture de la vanne Vz provoque une dépression, le retour de la membrane 20 vers sa configuration de repos poussant le fluide vers l'extérieur, via l'orifice d'entrée/sortie. 11

[0043] Sur la figure 3D, la membrane 20 est étirée vers l'intérieur de la cavité 10 par dépression de la pompe et/ou compression, permettant ainsi de libérer tout le fluide F présent dans le réservoir Rx et donc de limiter les pertes de fluide.

[0044] Les billes B sont logées à l'intérieur du réservoir extensible. L'emploi d'un tel réservoir à volume extensible présente plusieurs avantages. Il permet en effet de :

- Stocker un volume de fluide dans un réservoir complètement fermé (sans événement), évitant ainsi tout risque de contamination entre les substances présentes dans le réservoir et l'extérieur ;
- Stocker un volume de fluide sans connaître précisément le volume exact introduit ;
- Stocker un volume de fluide contenant une certaine quantité d'air en supplément ;
- Limiter les pertes de charge au remplissage, notamment lorsqu'il contient des billes d'un réactif, ceci d'autant plus que certaines billes peuvent également gonfler au contact d'un fluide ;
- Effectuer un mélange actif par des allers-retours pour augmenter l'interaction entre particules et molécules d'intérêt ;
- Comprimer l'ensemble des billes en fin du process, par compression de la membrane, afin de récupérer le plus de fluide possible ;

[0045] Le réservoir Rx peut présenter une profondeur comprise entre 0 et 3mm. Cette membrane 20 peut être réalisée dans un matériau polymère bi-composant hyper-élastique par exemple une silicone de type Ecoflex (marque déposée). Son épaisseur peut être comprise entre 100 et 500 μm .

[0046] Le module M5 de digestion des protéines ciblées contenues dans l'échantillon plasmatique comporte un réservoir dans lequel est placée une enzyme, par exemple de type trypsin, ou un mélange d'enzymes protéolytiques. Comme le réservoir du module précédent, le réservoir employé peut être un réservoir Rx de type

extensible, identique à celui décrit ci-dessus. Le module M5 peut également comporter un système d'agitation magnétique et un système de chauffage 3 (notamment une résistance chauffante et une alimentation électrique) pour chauffer la chambre du réservoir à une température déterminée afin d'assurer la réaction de digestion des protéines. La surface interne du réservoir pourra être enduite de l'enzyme ou du mélange d'enzymes nécessaire à la digestion. Dans une autre variante de réalisation ou en complément, on peut imaginer que l'enzyme ou le mélange d'enzymes soit présent dans le réservoir, par exemple sous une forme lyophilisée, greffée sur des particules ou sur des piliers intégrés à la carte.

[0047] Le module M6 de stockage est destiné à l'accrochage des peptides digérés en vue de les séparer et de les purifier. Pour cela, on peut utiliser une colonne de chromatographie liquide en phase inverse, par exemple de type multi-carbonée (par exemple C4, C8 ou C18) ou polymérique SPE fonctionnalisée sur laquelle les peptides digérés sont retenus et peuvent être lavés puis stabilisés. Cette colonne comporte une entrée et une sortie. En variante, le module peut comporter un réservoir dans lequel sont placées des billes de silice type C4 ou C18.

[0048] Grâce à ce module M6 de stockage les peptides digérés sont stabilisés dans la carte micro-fluidique. La stabilisation peut être réalisée par différentes méthodes, par exemple par fixation sur la résine type C4, C8 ou C18, par séchage, par congélation... Pour les stabiliser, l'automate programmable A envoie une commande à un système de refroidissement ou à un système de séchage par chauffage ou par passage d'air, agencé pour agir sur la dernière chambre en vue de stabiliser les peptides présents.

[0049] Une fois les peptides stabilisés, ceux-ci peuvent être conservés dans la carte, directement dans la colonne ou le réservoir du module ou dans un réservoir spécifique, après élution.

[0050] De même, de manière non limitative, le réservoir employé dans ce module de stockage peut être de type extensible, comme ceux déjà employés pour le module de déplétion/enrichissement et le module de digestion. Comme des billes y sont aussi placées, les avantages décrits ci-dessus pour le réservoir extensible du module de déplétion/enrichissement sont également présents.

[0051] Partant de ces différents modules, plusieurs architectures fluidiques peuvent être envisagées sur la carte. Les figures 4A à 4D représentent ainsi quatre architectures distinctes envisageables. Dans ces différentes architectures, les références restent identiques, tant que les composants fluidiques sont les mêmes.

[0052] Sur la figure 4A, l'architecture fluidique est la suivante :

- L'ensemble de pompage EP comporte deux pompes P1, P2, une première pompe P1 employée pour la séparation, la calibration du volume de plasma et la déplétion/enrichissement et une deuxième pompe

P2 dédiée aux opérations de digestion et de stabilisation.

- 5 - Le module M1 d'injection ou de stockage comporte un réservoir R1 de stockage de l'échantillon sanguin à traiter.
- 10 - Le module M2 de séparation comporte une chambre CH1 séparée en deux espaces par une membrane séparative. Le premier espace est relié par une liaison fluidique L0 au réservoir R1 de stockage et le deuxième espace est relié par une liaison fluidique L1 à la première pompe P1 via une vanne V1. Le module M2 de séparation comporte également un réservoir R2 de stockage du plasma séparé relié à la pompe P1 par une liaison fluidique L2 via une vanne V2.
- 15 - Le module M3 de calibration comporte un réservoir R3 destiné à recevoir le volume calibré relié par une liaison fluidique L3 à la première pompe P1 via une vanne V3.
- 20 - Le module M4 de déplétion/enrichissement comporte un réservoir R4 extensible.
- 25 - Le réservoir R4 extensible est relié par une liaison fluidique L4 via une vanne V4 à la première pompe P1 et par une autre liaison fluidique L5 via une vanne V5 à la deuxième pompe P2.
- 30 - Un réservoir R5 destiné à recevoir un liquide tampon (par exemple du bicarbonate d'ammonium) est également relié par une liaison fluidique L6 via une vanne V6 à la première pompe P1 et par une liaison fluidique L7 via une vanne V7 à la deuxième pompe P2.
- 35 - Le module M5 de digestion comporte un réservoir R6. Ce réservoir R6 peut être de type extensible tel que décrit ci-dessus.
- 40 - Le réservoir R6 est relié par une liaison fluidique L8 via une vanne V8 à la deuxième pompe P2.
- 45 - Le module de digestion comporte des moyens de chauffage de son réservoir R6 et de la deuxième pompe P2, commandés pour favoriser la réaction de digestion lors du processus de préparation.
- 50 - Un réservoir R7 poubelle est relié par une liaison fluidique L9 via une vanne V9 à la deuxième pompe P2.
- 55 - Le module M6 de stockage comporte une colonne CL de chromatographie liquide en phase inverse.
- L'entrée de la colonne CL du module M6 de stockage

est reliée par une liaison fluidique L10 via une vanne V10 à la deuxième pompe P2 et la sortie de la colonne CL peut être reliée à plusieurs réservoirs en parallèle, un réservoir R8 de collecte après élution par une liaison fluidique L11 via une vanne V11, un réservoir R9 pour le mélange par une liaison fluidique L12 via une vanne V12 et à un réservoir R10 poubelle par une liaison fluidique L13 via une vanne V13 (ce réservoir R10 pouvant être identique au réservoir R7).

- Un réservoir R11 destiné à recevoir un liquide tampon (acétонитрил par exemple) est également relié par une liaison fluidique L14 via une vanne V14 à la deuxième pompe P2.
- Un réservoir R12 peut également être prévu pour récupérer l'échantillon sanguin non plasmatique séparé par le module M1 de séparation.
- Les réservoirs R1, R5 et R11 peuvent comporter un point d'injection ayant une connectique de type Luer (marque déposée) pour injection de liquide.
- Les deux pompes P1, P2 ont des cavités de volumes différents, la pompe P1, dédiée à la calibration, présentant un volume adapté pour ajuster le volume calibré de manière précise. La pompe P2 peut présenter un volume plus important pour permettre de déplacer plus de liquide dans la carte à chaque cycle de pompage.

[0053] Sur la figure 4B, l'architecture fluidique est identique à celle de la figure 4A, à l'exception que la colonne CL du module de stockage est remplacée par un réservoir R12 de type extensible. Comme la carte C ne comporte pas de colonne de chromatographie, les réservoirs R9 et R10 ne sont pas nécessaires. La stabilisation est réalisée dans le réservoir R12.

[0054] Sur la figure 4C, l'architecture fluidique proposée présente la particularité de ne comporter qu'une seule pompe P1 pour effectuer toutes les étapes de préparation. L'unique pompe P1 est agencée au milieu d'une architecture en étoile. Chaque liaison fluidique allant de la pompe vers un réservoir distinct est contrôlée par une vanne distincte. La pompe P1 permet donc d'effectuer une calibration et d'effectuer toutes les étapes de transferts de liquide dans le circuit fluidique de la carte. Comme pour l'architecture de la figure 4B, le module M6 de stockage, employé dans l'architecture de la figure 4C, utilise un réservoir de type extensible.

[0055] La figure 4D reprend l'architecture en étoile autour d'une seule pompe P1 de la figure 4C. En revanche, Elle présente la particularité de ne comporter qu'un seul réservoir R50 pour réaliser d'abord l'enrichissement puis la digestion. Ce réservoir R50 peut être de type extensible. Il renferme les billes ou piliers fonctionnalisés nécessaires à l'étape d'enrichissement/déplétion. Un ré-

servoir R40 est ajouté pour stocker la trypsine (par exemple sous forme séchée). Celle-ci sera ensuite apportée dans le réservoir R50 lors de l'étape de digestion.

[0056] De manière non limitative, chaque réservoir de type extensible employé ne comporte qu'un seul orifice, employé à la fois pour l'entrée de fluide dans le réservoir et pour la sortie de fluide en dehors du réservoir. Il présente donc une configuration identique à celle décrite ci-dessus en liaison avec les figures 3A à 3D.

[0057] Les figures 5A à 5N illustre les différentes étapes de préparation d'un échantillon sanguin sur une carte micro-fluidique présentant l'architecture de la figure 4A. Il faut comprendre que ces étapes sont bien entendu réalisables de manière similaire avec les deux autres architectures représentées sur les figures 4B, 4C ou 4D. Pour chaque étape, il faut comprendre qu'un transfert de liquide est réalisé par les liaisons fluidiques appropriées et que les vannes présentes sur ces liaisons doivent être ouvertes pour passer le liquide, les autres vannes de la carte restant fermés pour éviter toute fuite de fluide en dehors du circuit souhaité.

Figure 5A

[0058]

- L'échantillon sanguin présent dans le réservoir de stockage R1 est pompé à travers la membrane séparative par la première pompe P1. L'échantillon de plasma séparé est récolté dans le réservoir R2.

Figure 5B

[0059]

[0059]

- La première pompe P1 est actionnée pour produire un volume calibré de plasma. Plusieurs cycles de pompage successifs peuvent être réalisés pour obtenir le volume calibré souhaité dans le réservoir R3 dédié à recevoir le volume calibré de plasma.

Figure 5C

[0060]

[0060]

- La deuxième pompe P2 est actionnée pour aspirer le bicarbonate d'ammonium présent dans le réservoir R5 et l'injecter dans le réservoir R4 extensible du module de déplétion/enrichissement contenant des billes de déplétion (type Cibacron), afin de conditionner ces billes.

Figure 5D

[0061]

- La deuxième pompe P2 est actionnée pour aspirer le liquide présent dans le réservoir R4 extensible

pour l'évacuer vers le réservoir R7 poubelle.

Figure 5E

[0062]

- La première pompe P1 est actionnée pour transférer le volume calibré de plasma contenu dans le réservoir R3 vers le réservoir R4 extensible contenant les billes de déplétion. Sous la pression du liquide injecté, la membrane 20 du réservoir R4 peut s'étirer vers l'extérieur, augmentant le volume du réservoir R4 et permettant de limiter les pertes de charge lors du remplissage.

Figure 5F

[0063]

- La première pompe P1 est actionnée pour aspirer du tampon (par exemple de type bicarbonate) présent dans le réservoir R5 et l'injecter dans le réservoir R3 de volume calibré de plasma pour rincer celui-ci et la cavité de la pompe P1 et réinjecter ensuite le liquide présent dans le réservoir R3 de volume calibré vers le réservoir R4 extensible. Il s'agit ainsi de s'assurer que tout le volume calibré de plasma présent dans le réservoir R3 est bien transféré vers le réservoir R4. Dans le réservoir R4, l'opération de déplétion/enrichissement a lieu par contact du plasma avec les billes contenues dans le réservoir.

Figure 5G

[0064]

- Une opération de dilution est effectuée à travers la deuxième pompe P2 pour aider à l'extraction de l'échantillon déplété. Pour bien assurer le mélange et une répartition homogène, plusieurs aller-retours entre la pompe P2 et le réservoir R4 du module de déplétion peuvent être effectués.

Figure 5H

[0065]

- La deuxième pompe P2 est actionnée pour transférer l'échantillon plasmatique présent dans le réservoir R4 extensible (échantillon où sont éliminées les protéines majoritaires qui restent globalement fixées sur les particules) vers le réservoir R6 du module de digestion.

Figure 5I

[0066] Pour bien assurer le mélange et la répartition homogène, plusieurs aller-retours entre la pompe P2 et

le réservoir R6 du module de digestion peuvent être effectués. La digestion des protéines ciblées est réalisée dans le réservoir R6, permettant d'obtenir des peptides. La digestion peut être réalisée en utilisant une enzyme de type trypsine placée initialement dans le réservoir R6, par exemple sous forme lyophilisée. En attente du conditionnement de la colonne CL (figure 5J et 5K), le digest obtenu est maintenu dans la chambre R6.

Figure 5J

[0067]

- Il s'agit d'une étape de conditionnement de la colonne CL. Par actionnement de la pompe P2, un solvant de type ACN est injecté depuis le réservoir R11 à travers la colonne CL pour la préparer et jusqu'au réservoir poubelle R10.

Figure 5K

[0068]

- Par actionnement de la deuxième pompe P2, élimination du solvant (ACN) employé pour le conditionnement de la colonne CL du réservoir R5 (tampon) vers le réservoir poubelle R10. Cette étape peut être répétée pour éliminer toute trace de solvant. La colonne est alors placée dans des conditions optimales de fonctionnement.

Figure 5L

[0069]

- La deuxième pompe P2 est actionnée pour transférer l'échantillon présent dans le réservoir R6 extensible du module de digestion vers la colonne CL de chromatographie du module de stockage. Les peptides digérés sont injectés à travers l'entrée de la colonne CL pour stabilisation. Plusieurs aller-retours peuvent être réalisés. A la fin du process, l'échantillon déplété des peptides se retrouve dans le réservoir R9.
- Les peptides sont stockés dans la colonne CL.

Figure 5M

[0070]

- Pour récupérer les peptides, la deuxième pompe P2 est actionnée pour injecter un liquide d'élution en provenance du réservoir R11 à travers la colonne CL et éluer les peptides par la sortie de la colonne vers un réservoir R8 de sortie. Le liquide d'élution peut être de l'acétonitrile.

[0071] Ces différentes étapes mises en œuvre à l'aide de l'architecture de la figure 4A sont bien entendu parfaitement envisageables dans les architectures 4B et 4C. L'architecture en étoile autour de la pompe P1 permet de transférer rapidement un liquide d'un réservoir à un autre.

[0072] On peut noter que dans l'architecture de la figure 4D, l'échantillon de plasma est amené directement dans le réservoir R50 qui contient des particules fonctionnalisées pour retenir les protéines cibles. Après incubation, l'excès de liquide est évacué vers le réservoir poubelle R7. Ensuite, un tampon avec de la trypsine est injecté depuis le réservoir R40 dans ce réservoir R50 pour effectuer une digestion sur billes. Enfin, l'échantillon de protéines digérés (les peptides) est déplacé pour l'étape suivante, tout en laissant les billes dans le réservoir R50 d'enrichissement. Bien évidemment, la trypsine peut-être sous forme lyophilisée dans le réservoir R40. Dans ce cas, un tampon de re-suspension doit être amené dans le réservoir R40 pour remettre la trypsine en solution avant de procéder à la digestion.

[0073] De manière non limitative, la carte micro-fluidique C peut ne comporter qu'une seule couche intermédiaire intercalée entre ses deux couches principales, cette couche intermédiaire étant réalisée dans le matériau hyper-élastique et formant à la fois la membrane 50 de chaque pompe de l'ensemble de pompage et la membrane 20 des réservoirs extensibles utilisés. Le procédé de fabrication de la carte se trouve ainsi simplifié.

[0074] Les solutions présentées ci-dessus présentent ainsi de nombreux avantages, parmi lesquels :

- Une unique carte micro-fluidique de taille standard pour effectuer toutes les étapes de préparation, permettant d'obtenir une architecture compacte ;
- Une carte micro-fluidique présentant un nombre limité d'éléments fluidiques (grâce notamment à l'architecture en étoile autour de la pompe), rendant l'architecture particulièrement robuste ;
- Un emploi de réservoirs extensibles pour certaines étapes du procédé de préparation, permettant notamment de limiter les pertes de charge et d'offrir bien d'autres avantages ;
- Pas de volume mort, grâce à l'emploi de réservoirs extensibles ;

Revendications

1. Dispositif micro-fluidique comprenant un élément-support rigide, au moins une pompe actionnable par effet pneumatique, réalisée dans ledit élément-support et un réservoir à volume modulable réalisé dans ledit élément-support et connecté à ladite pompe via un canal micro-fluidique d'entrée/sortie, ledit réservoir

voir (Rx) étant caractérisé en ce qu'il comporte :

- Une cavité (10) réalisée dans ledit support, ladite cavité comportant au moins une ouverture débouchant sur une surface dudit élément-support,
- Un unique orifice (11) débouchant à l'intérieur de ladite cavité et sur lequel est connecté ledit canal micro-fluidique,
- Une première membrane (20) souple agencée pour refermer ladite ouverture et déformable élastiquement vers l'extérieur de l'élément-support par actionnement en pression de ladite pompe, lors d'une injection d'un liquide dans la cavité par le canal micro-fluidique d'entrée/sortie, la déformation dudit réservoir au remplissage étant limitée uniquement par les caractéristiques de déformabilité élastique de sa première membrane (20),
- Une surface développée fonctionnalisée (B), formée d'un réactif ou enduite d'un réactif, placées dans ladite cavité du réservoir à volume modulable.

- 25 2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la surface développée fonctionnalisée est formée sur des billes et/ou des piliers.
- 30 3. Dispositif selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la première membrane (20) est réalisée dans un matériau hyper-élastique présentant une surface apte à passer d'une première superficie à une deuxième superficie, la deuxième superficie étant égale à au moins cinq fois la première superficie.
- 35 4. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comporte une vanne (Vz) piloteable agencée sur ledit canal micro-fluidique d'entrée/sortie et des moyens de commande de ladite vanne entre une position ouverte et une position fermée.
- 40 5. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite pompe (P1, P2) comporte une cavité réalisée dans ledit élément-support et une deuxième membrane (50) déformable séparant de manière étanche ladite cavité en un premier volume (52) destiné à être connecté à un point de commande pneumatique et un deuxième volume (51) dans lequel débouche ledit canal micro-fluidique d'entrée/sortie.
- 45 6. Dispositif selon la revendication 5, caractérisé en ce que la deuxième membrane (50) est réalisée dans un matériau hyper-élastique présentant une surface apte à passer d'une première superficie à une deuxième superficie, la deuxième superficie

étant égale à au moins cinq fois la première superficie.

7. Carte micro-fluidique (C) de préparation d'un échantillon sanguin, comportant un unique support sur lequel sont agencés plusieurs modules destinés à la préparation d'un échantillon sanguin, listés ci-dessous :

- Un module (M2) de séparation du plasma présent dans l'échantillon sanguin, 10
- Un module (M3) de stockage et de calibration du plasma obtenu,
- Un module (M4) de déplétion ou d'enrichissement du plasma sanguin à l'aide de billes pour capturer les protéines majoritaires et conserver les protéines ciblées, 15
- Un module (M5) de digestion des protéines ciblées,
- Un module (M6) de stockage, 20

5

et la deuxième membrane (50).

13. Système de préparation d'un échantillon sanguin, **caractérisé en ce qu'il comporte :**

- Une carte micro-fluidique (C) telle que définie dans l'une des revendications 7 à 12,
- Un système d'actionnement pneumatique (SP) comprenant plusieurs points de commande pneumatiques associés auxdits modules présents sur ladite carte micro-fluidique,
- Une unité de traitement et de commande dudit système d'actionnement pneumatique (SP), configurée pour exécuter une séquence de commande adaptée pour préparer un échantillon sanguin dans ladite carte micro-fluidique (C).

Caractérisée en ce que :

- Le module (M4) de déplétion ou d'enrichissement comporte un dispositif micro-fluidique tel que décrit dans l'une des revendications 1 à 6. 25

8. Carte selon la revendication 7, **caractérisée en ce que** le module (M6) de stockage comporte également un dispositif micro-fluidique tel que défini dans l'une des revendications 1 à 6. 30

9. Carte selon la revendication 7 ou 8, **caractérisé en ce que** le module (M5) de digestion comporte un dispositif micro-fluidique tel que défini dans l'une des revendications 1 à 6. 35

10. Carte selon l'une des revendications 7 à 9, **caractérisée en ce que** le module (M5) de digestion comporte une surface développée fonctionnalisée comprenant une enzyme dédiée à la digestion des protéines cibles. 40

11. Carte selon l'une des revendications 7 à 10, **caractérisée en ce que** ladite pompe est connectée, via plusieurs liaisons fluidiques agencées en étoile autour de la pompe, à plusieurs réservoirs appartenant auxdits modules. 45

12. Carte selon la revendication 11, **caractérisée en ce que** son support est réalisé par assemblage de plusieurs couches superposées, composées d'au moins deux couches externes et d'une couche intermédiaire intercalée entre les deux couches externes, au moins l'une des deux couches externes comportant un circuit fluidique, ladite couche intermédiaire étant réalisée dans ledit matériau hyper-élastique et formant à la fois la première membrane (20) 50
55

Fig. 1

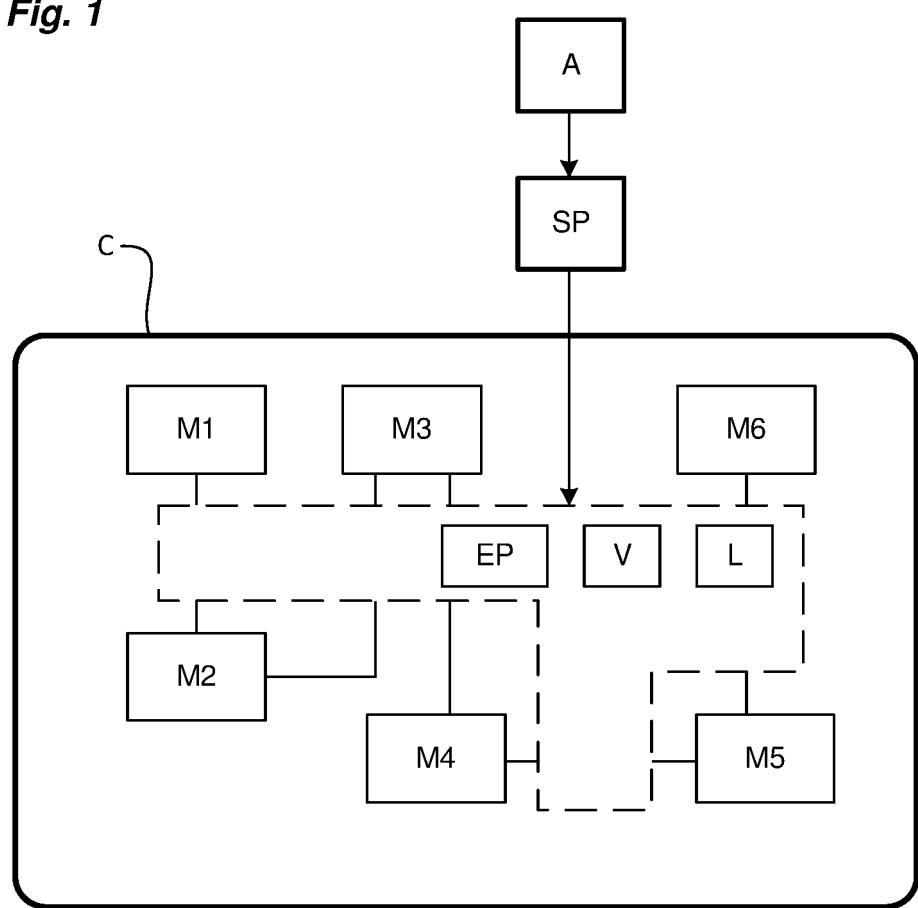


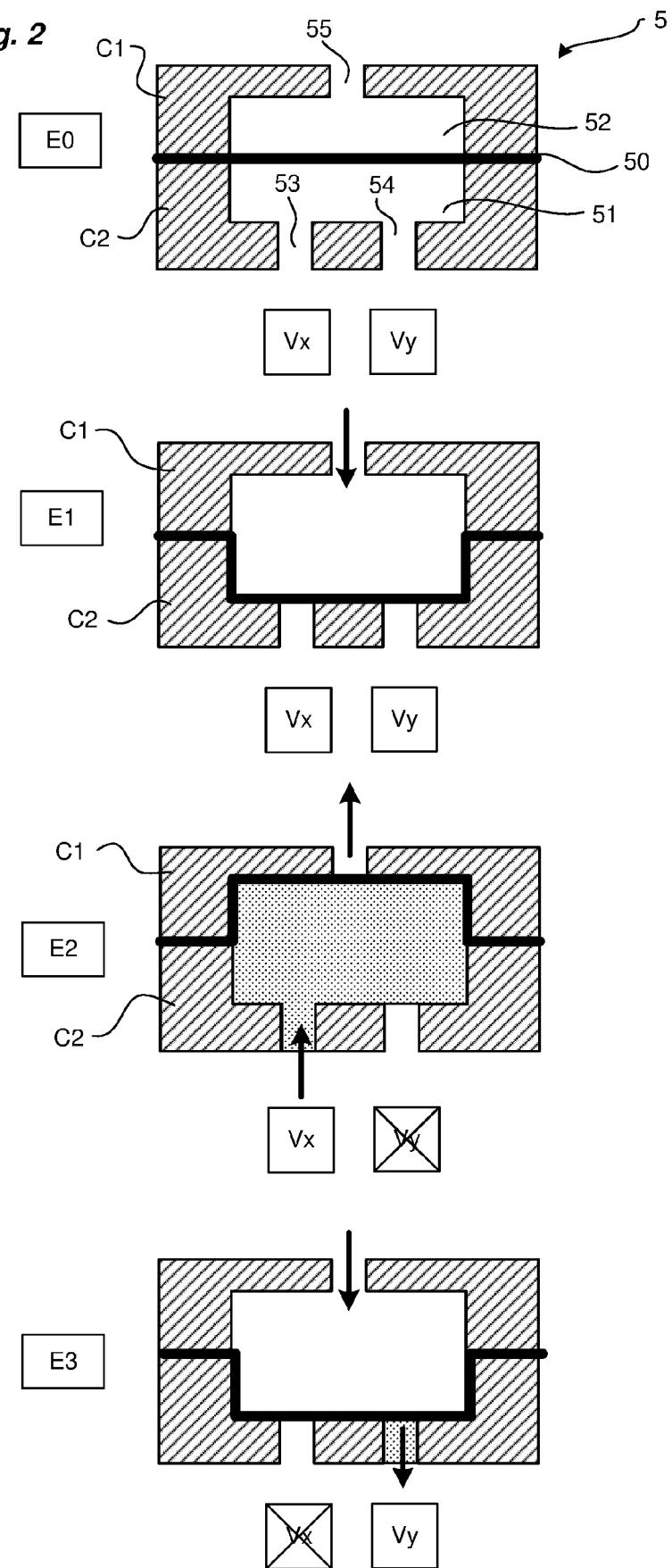
Fig. 2

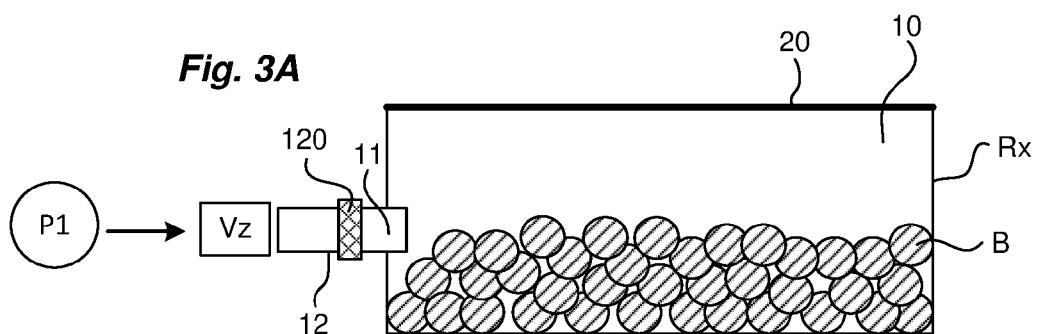
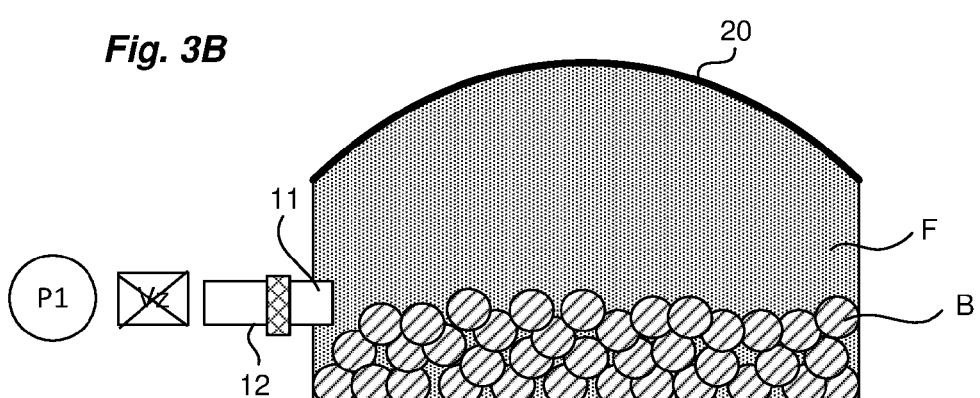
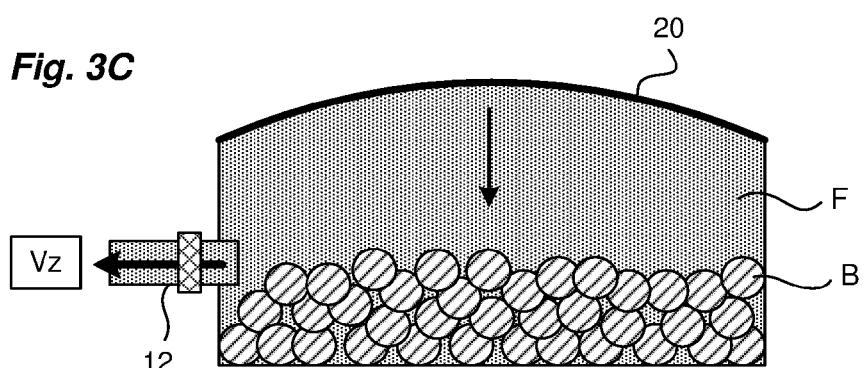
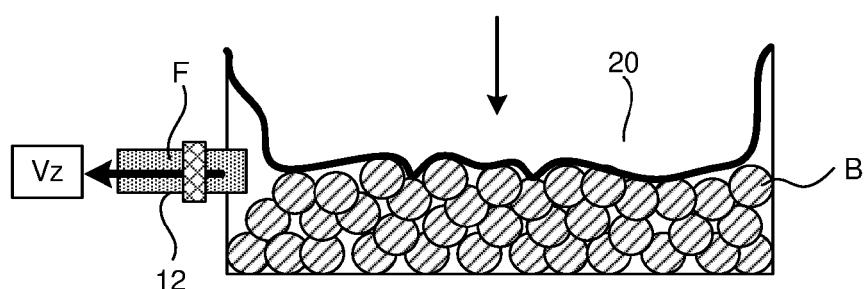
Fig. 3A**Fig. 3B****Fig. 3C****Fig. 3D**

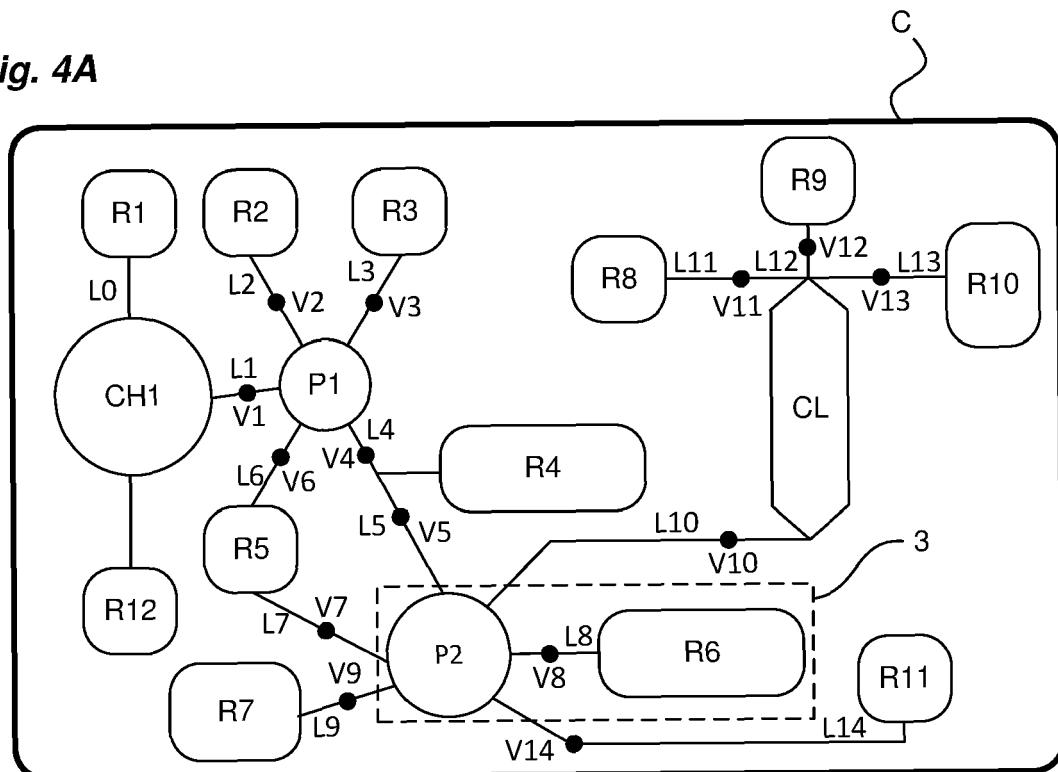
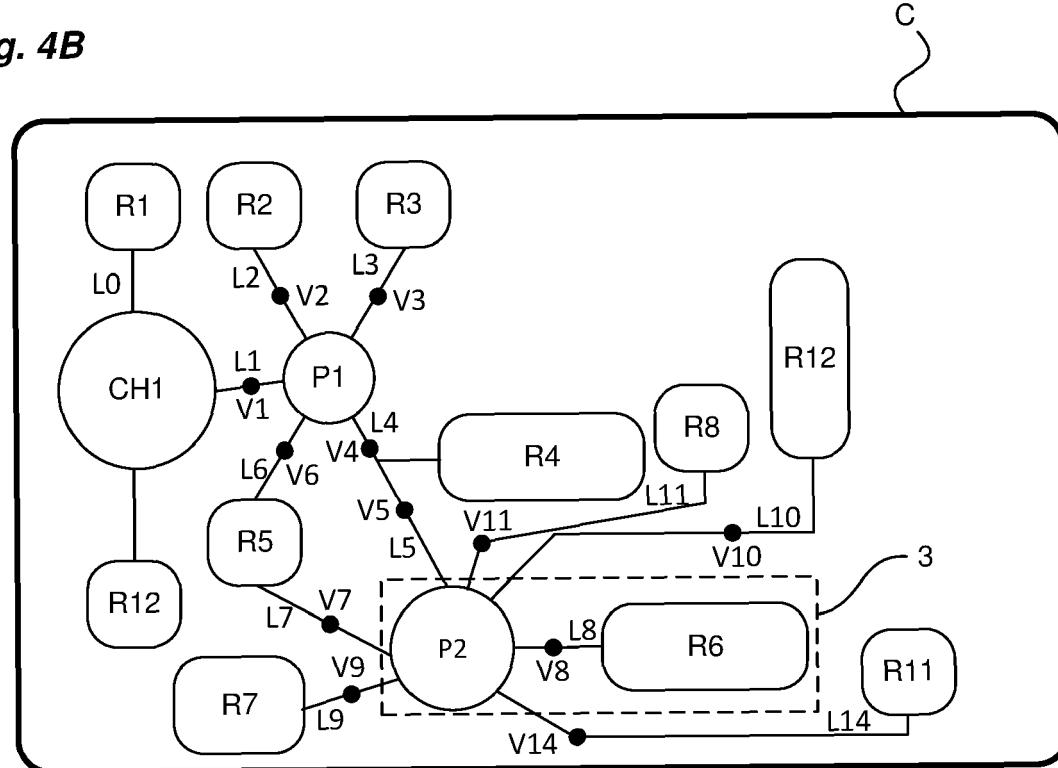
Fig. 4A**Fig. 4B**

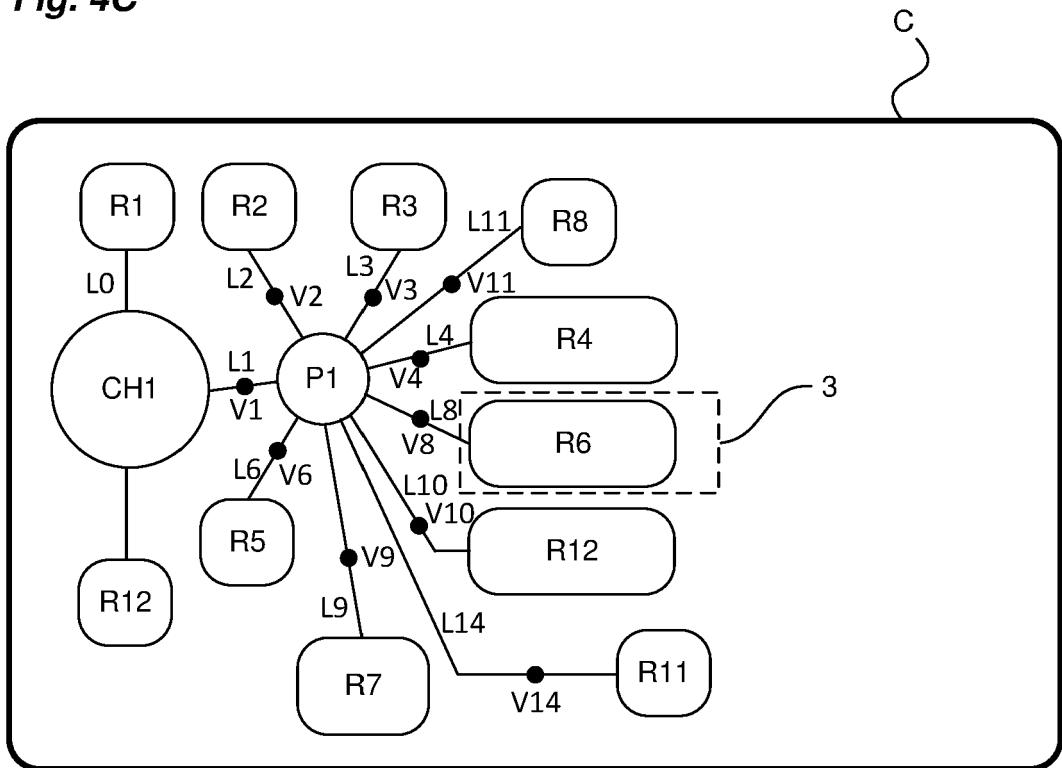
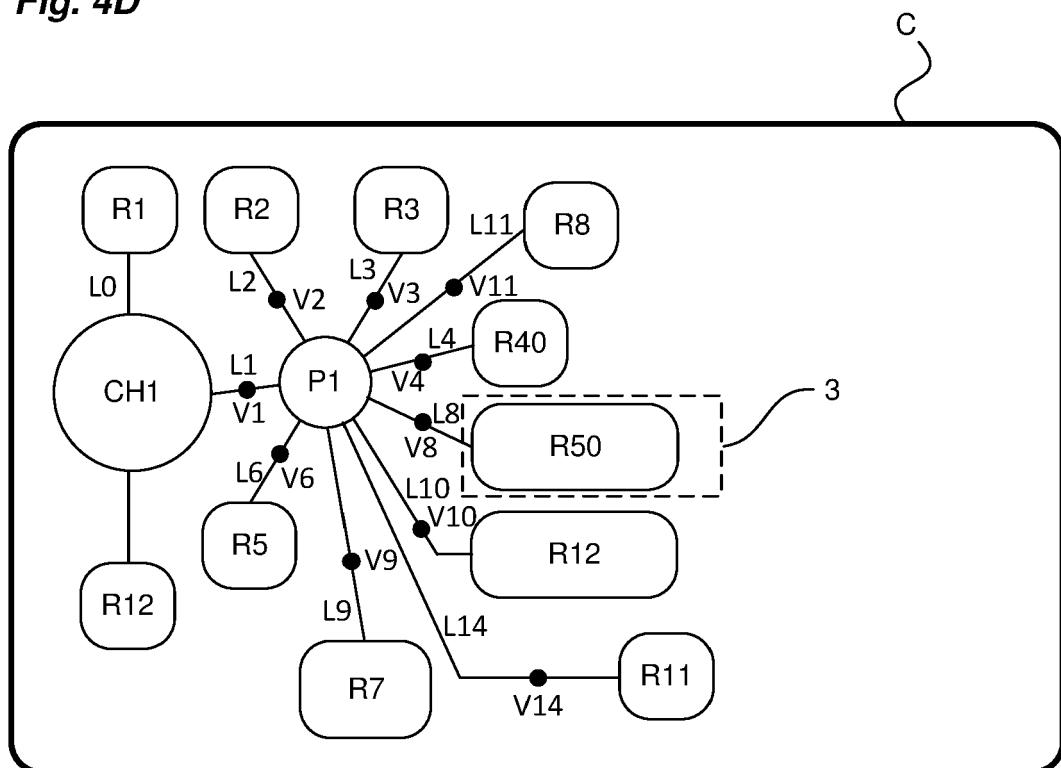
Fig. 4C**Fig. 4D**

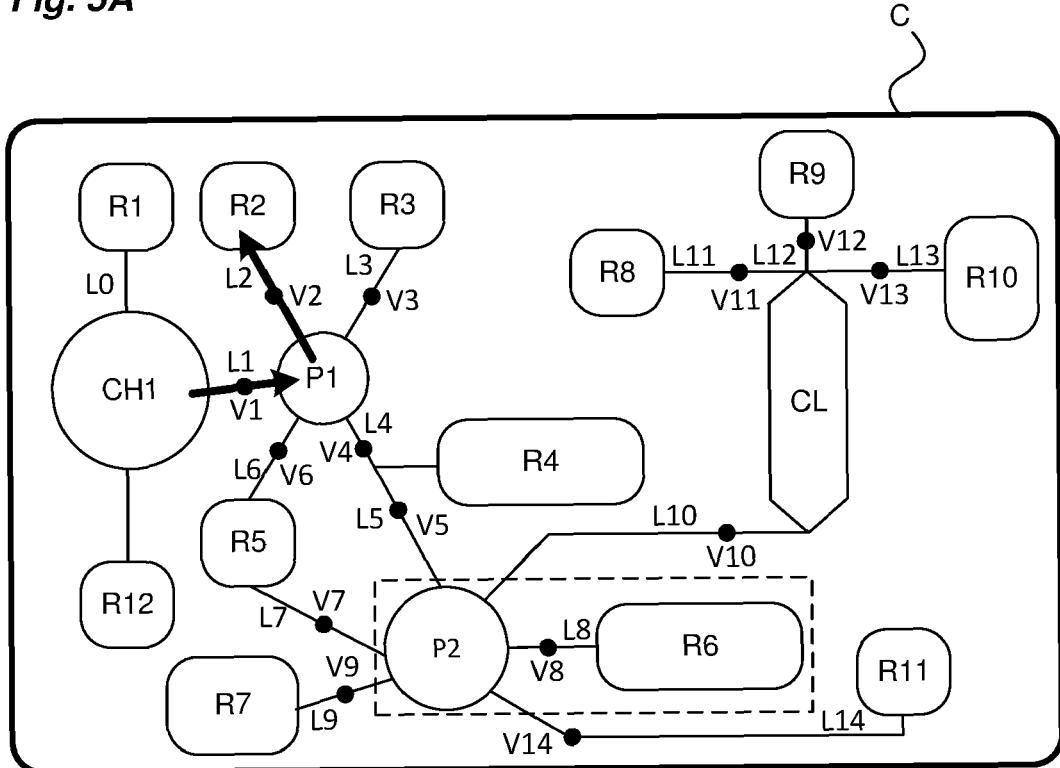
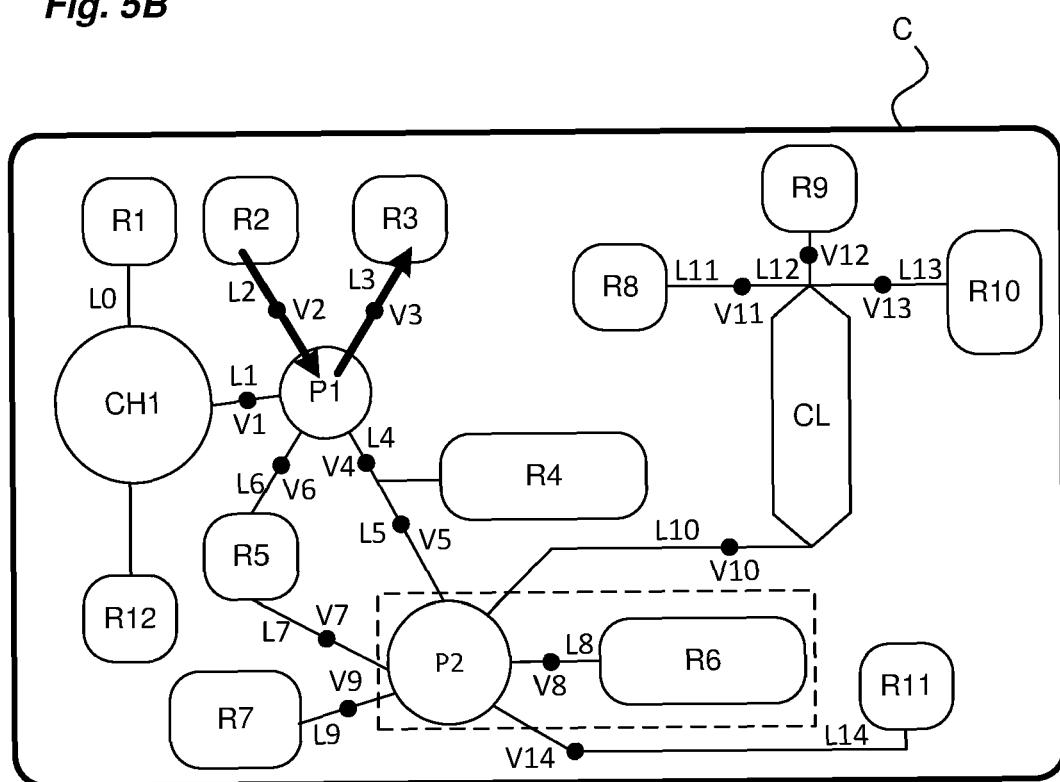
Fig. 5A**Fig. 5B**

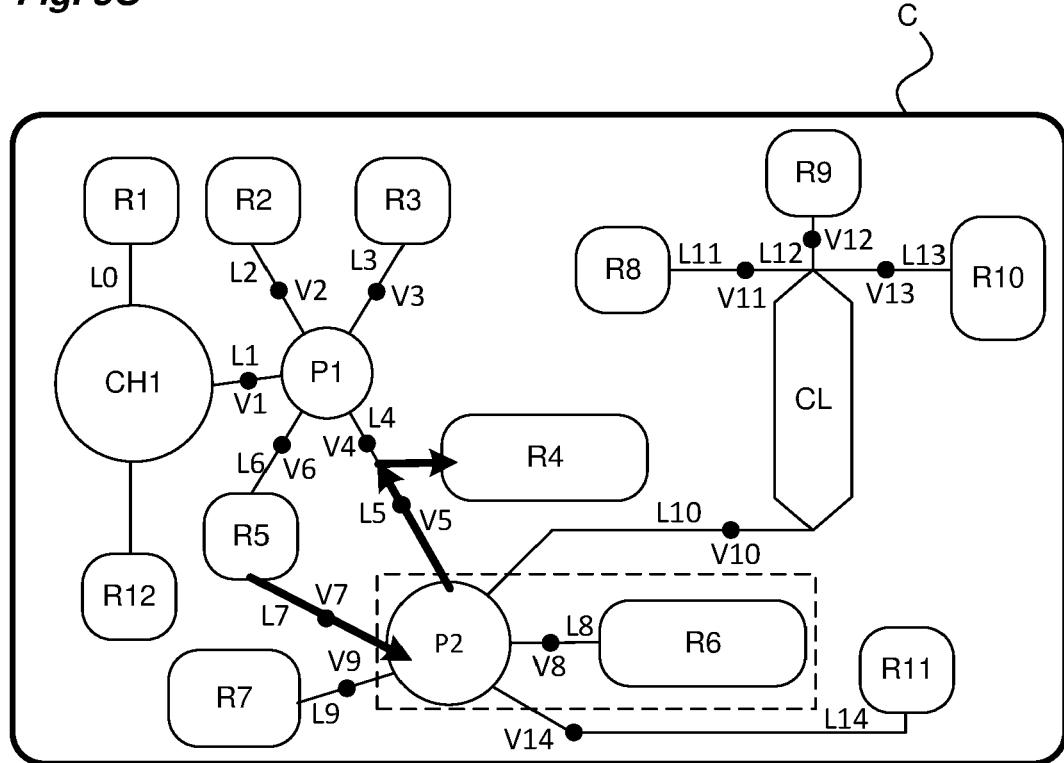
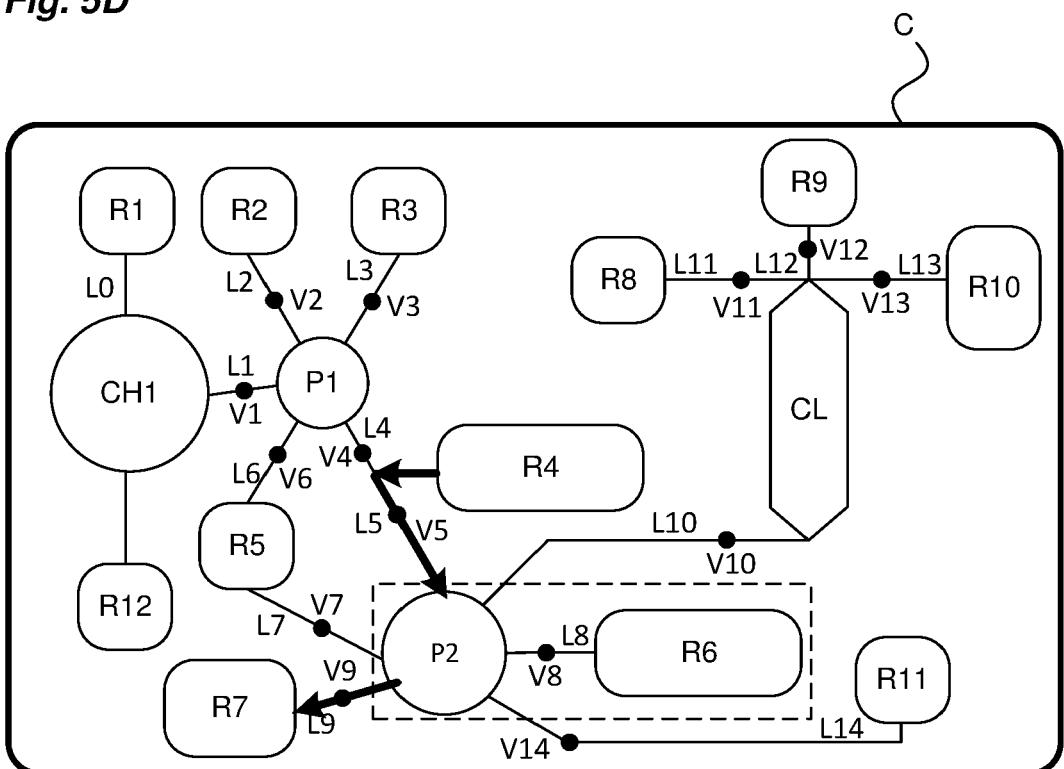
Fig. 5C**Fig. 5D**

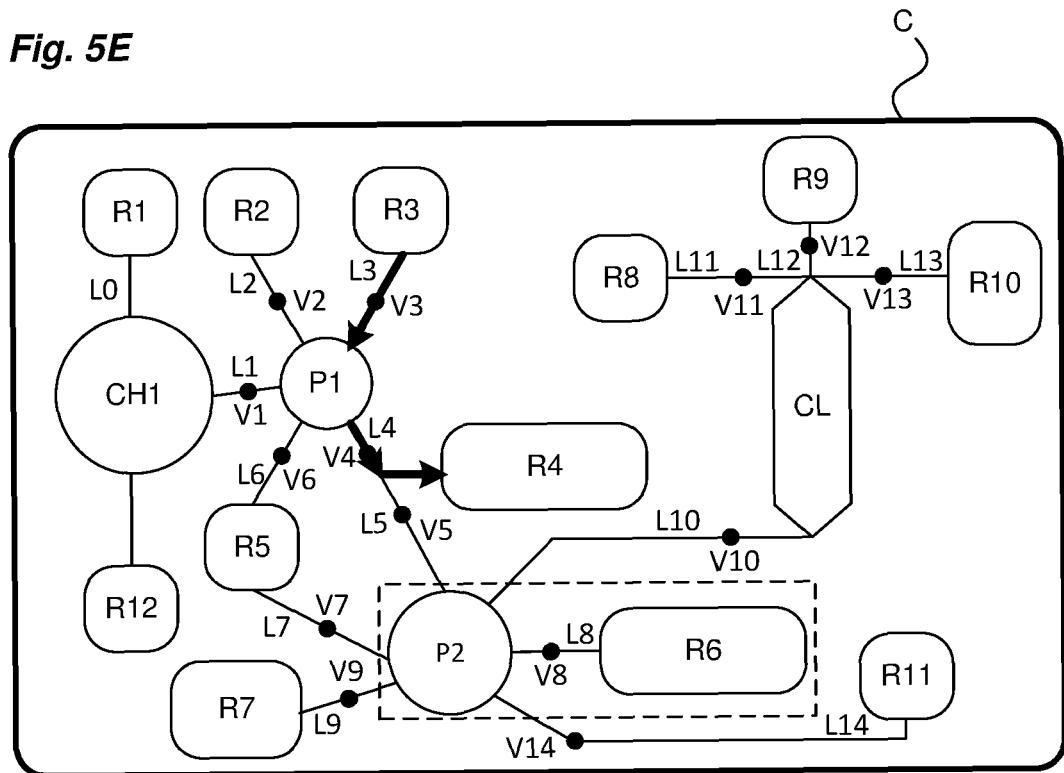
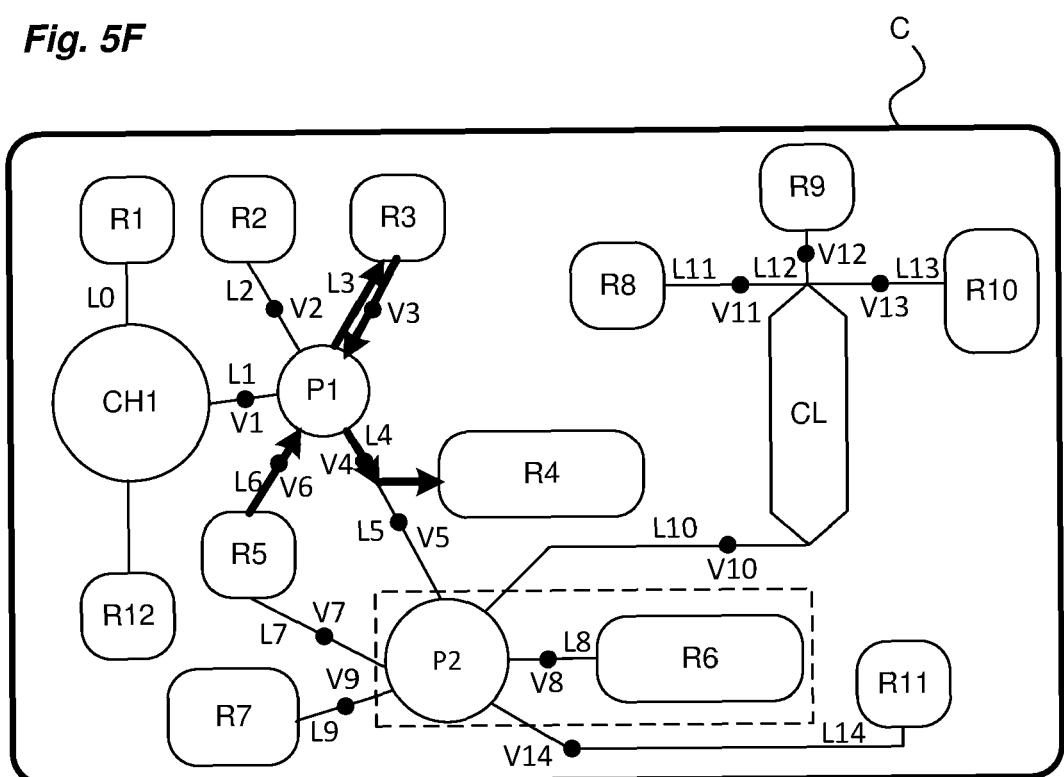
Fig. 5E**Fig. 5F**

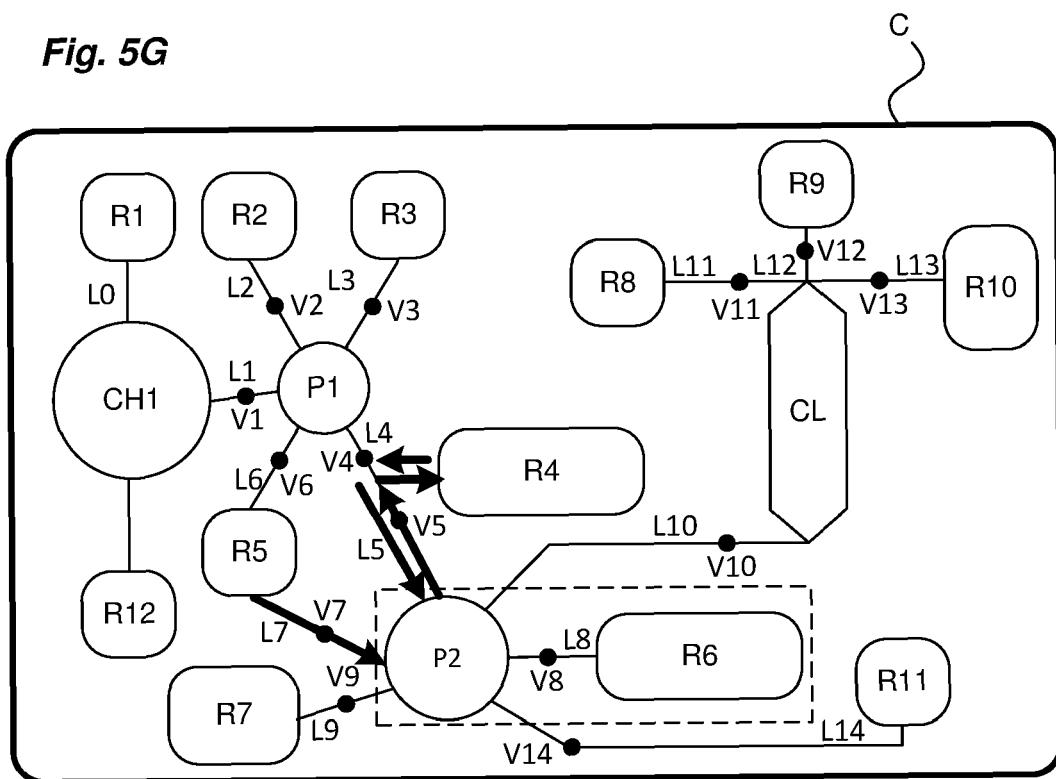
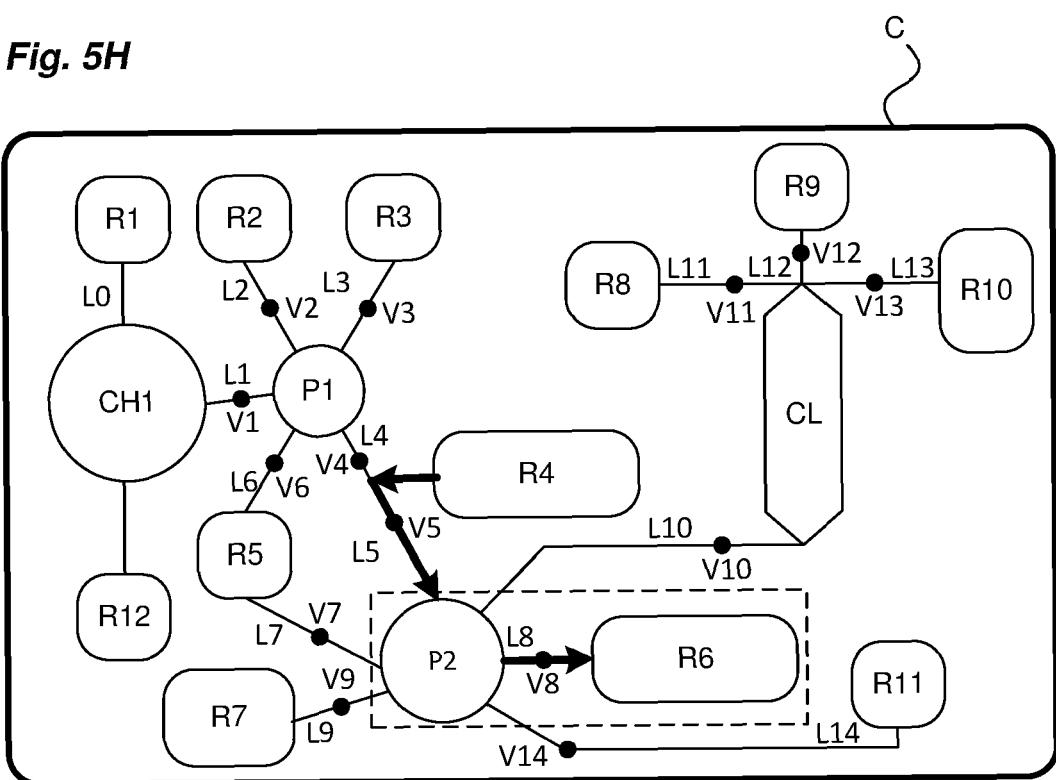
Fig. 5G**Fig. 5H**

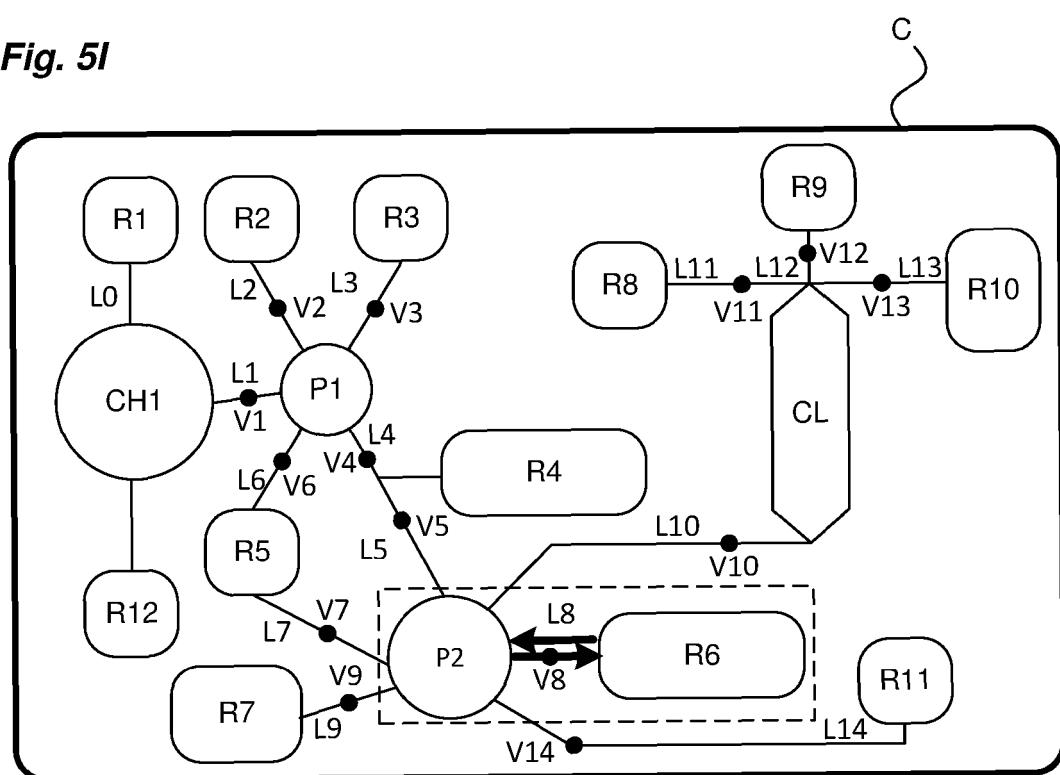
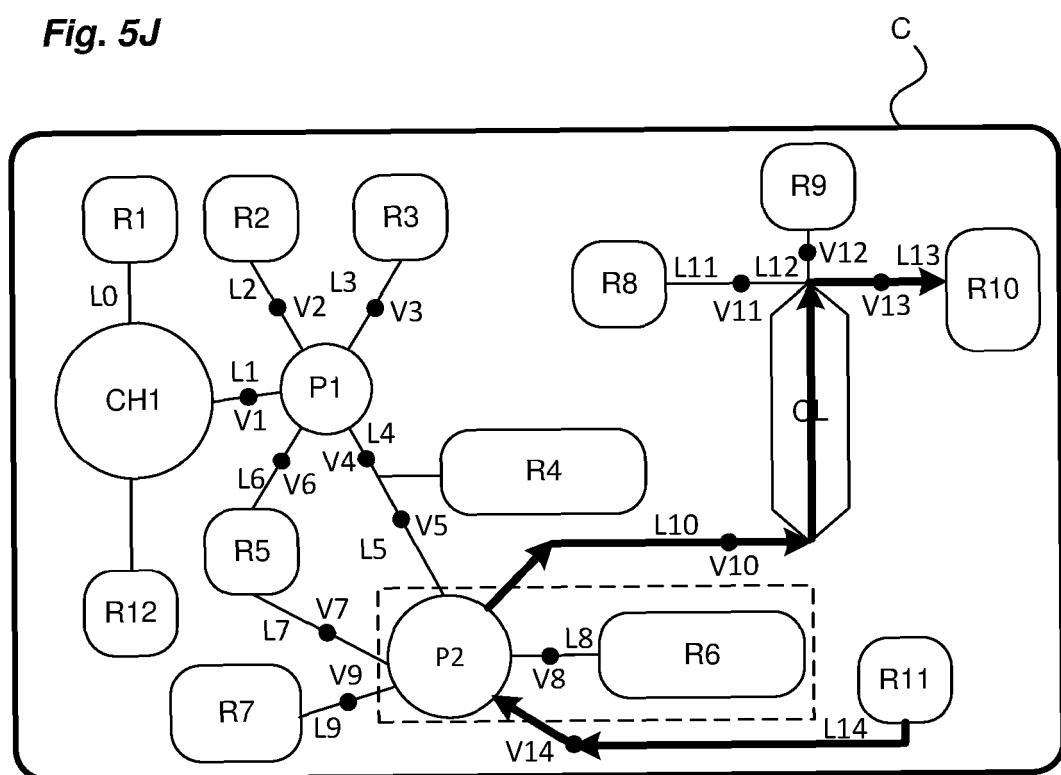
Fig. 5I**Fig. 5J**

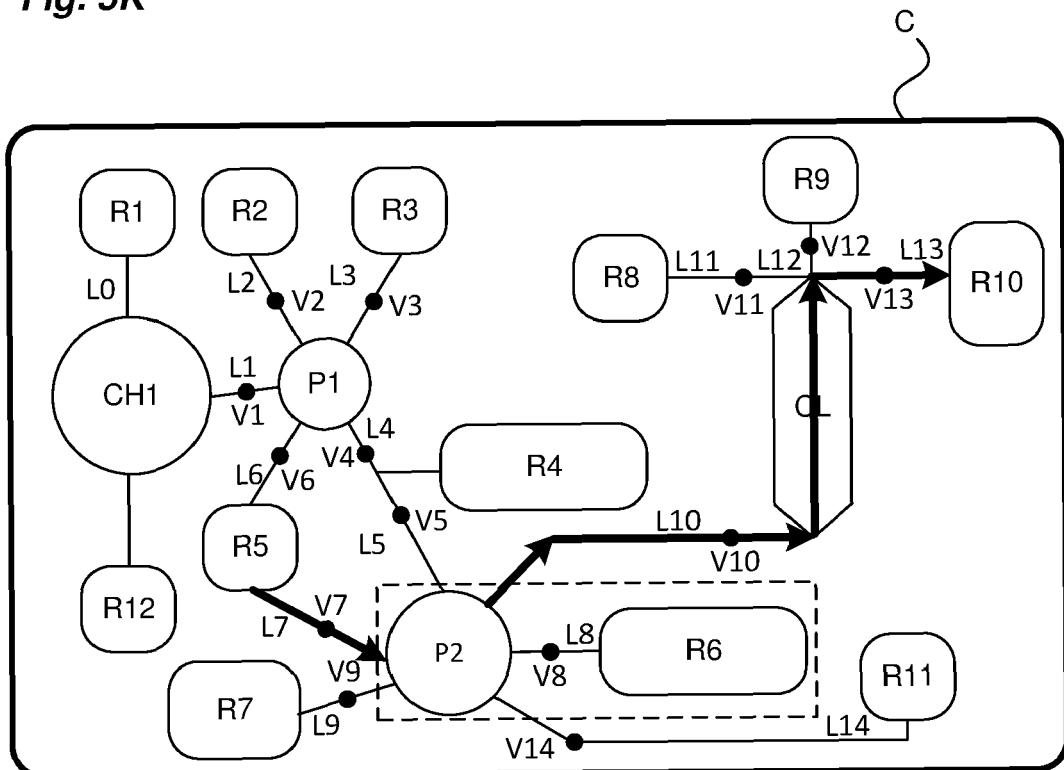
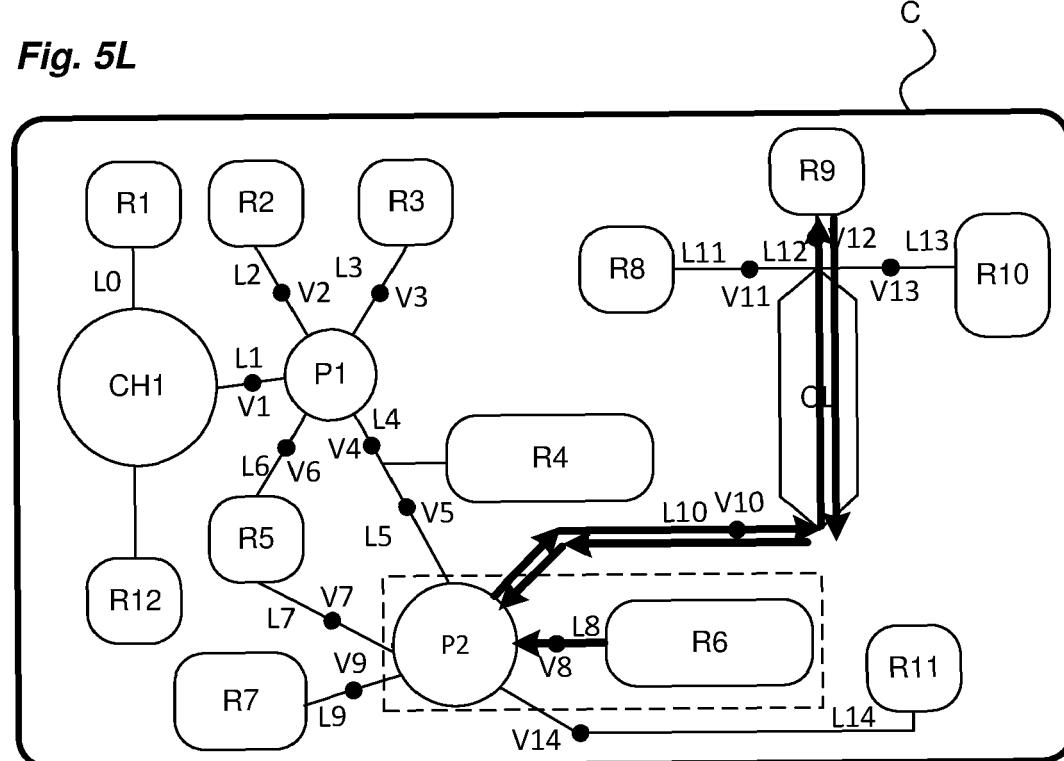
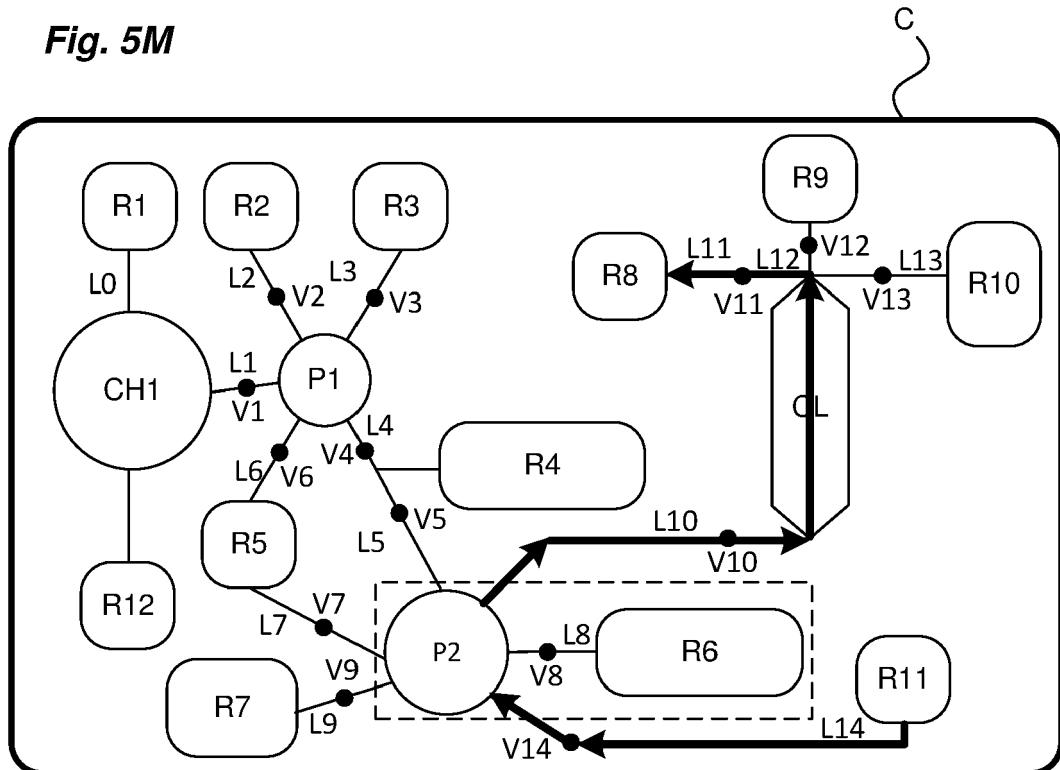
Fig. 5K**Fig. 5L**

Fig. 5M



RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande
EP 20 19 5121

5

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
10	X US 8 222 023 B2 (BATTRELL C FREDERICK [US]; GERDES JOHN [US] ET AL.) 17 juillet 2012 (2012-07-17) * colonne 24, ligne 31 - ligne 41 * * colonne 24, ligne 50 - colonne 25, ligne 40 * * colonne 26, lignes 1-2, 21-40 * * colonne 27, ligne 40 - ligne 47 * * colonne 28, ligne 42 - ligne 48 * * colonne 30, ligne 10 - ligne 21 * * colonne 31, ligne 45 - ligne 67 * * colonne 33, ligne 11 - colonne 34, ligne 9 * * figures 1-4, 7A-7C, 8, 12A, 12B, 13, 14A-14D *	1-13	INV. B01L3/00
15	-----		
20	X US 10 065 186 B2 (MICRONICS INC [US]) 4 septembre 2018 (2018-09-04) * colonne 10, ligne 44 - colonne 12, ligne 29 * * colonne 14, ligne 49 - colonne 15, ligne 27 * * colonne 15, ligne 52 - colonne 16, ligne 37 * * colonne 16, ligne 58 - colonne 17, ligne 12 * * colonne 18, ligne 27 - ligne 41 * * colonne 19, ligne 19 - colonne 20, ligne 47 * * figures 1,2,5A-5L,7A-7L,8A,8B,11,14A,14B,15,17,18A ,18B *	1-6	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
25	-----		B01L
30	-----		
35	-----		
40	-----		
45	Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications		
1	Lieu de la recherche La Haye	Date d'achèvement de la recherche 12 octobre 2020	Examinateur Bischoff, Laura
50	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	
55	EPO FORM 1503 03/82 (P04C02)		



RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande
EP 20 19 5121

5

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
10	A US 2013/130262 A1 (BATTRELL C FREDERICK [US] ET AL) 23 mai 2013 (2013-05-23) * alinéas [0102] - [0104], [0118] - [0123], [0127] - [0131], [0137] - [0141] * figures 1A-1B, 2, 3A-3B, 8A-8B, 9A-9L, 10A-10G, 14A-14C * -----	1-13	
15	A US 8 703 476 B2 (DE GIER RONALD CORNELIS [NL] ET AL.) 22 avril 2014 (2014-04-22) * colonne 9, ligne 31 - colonne 11, ligne 18 * * colonne 12, ligne 60 - colonne 13, ligne 45 * * figures 3, 4 *	1-13	
20			----- DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
25			
30			
35			
40			
45			
1	Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications		
50	Lieu de la recherche La Haye	Date d'achèvement de la recherche 12 octobre 2020	Examinateur Bischoff, Laura
	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
55	EPO FORM 1503.03.82 (P04C02)		

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET EUROPEEN NO.**

EP 20 19 5121

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

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

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

12-10-2020

10	Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
15	US 8222023	B2 17-07-2012	AU 2007225038 A1	20-09-2007
			EP 2007905 A2	31-12-2008
			ES 2393758 T3	27-12-2012
			HK 1126824 A1	24-05-2013
			JP 5254949 B2	07-08-2013
			JP 2009529883 A	27-08-2009
			US 2009148847 A1	11-06-2009
			US 2009148933 A1	11-06-2009
			US 2012329142 A1	27-12-2012
			WO 2007106579 A2	20-09-2007
			WO 2007106580 A2	20-09-2007
25	US 10065186	B2 04-09-2018	CN 104919191 A	16-09-2015
			EP 2935908 A1	28-10-2015
			JP 6498125 B2	10-04-2019
			JP 2016509151 A	24-03-2016
			KR 20150099816 A	01-09-2015
			US 2015352549 A1	10-12-2015
			WO 2014100732 A1	26-06-2014
30	US 2013130262	A1 23-05-2013	CA 2786569 A1	04-08-2011
			CN 102740976 A	17-10-2012
			EP 2528687 A2	05-12-2012
			JP 5791634 B2	07-10-2015
			JP 2013518289 A	20-05-2013
			KR 20130033345 A	03-04-2013
			US 2013130262 A1	23-05-2013
			US 2016193603 A1	07-07-2016
			WO 2011094577 A2	04-08-2011
40	US 8703476	B2 22-04-2014	AT 529186 T	15-11-2011
			CN 101213022 A	02-07-2008
			EP 1904234 A1	02-04-2008
			ES 2374970 T3	23-02-2012
			JP 5049274 B2	17-10-2012
			JP 2009500011 A	08-01-2009
			US 2010151565 A1	17-06-2010
			WO 2007004103 A1	11-01-2007
50				
55				

EPO FORM P0460

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

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

Documents brevets cités dans la description

- EP 3433609 A1 [0003]
- US 8703476 B [0004]
- US 2013130262 A1 [0004]