

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
3 septembre 2009 (03.09.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/106295 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61B 5/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2009/001308

(22) Date de dépôt international :
24 février 2009 (24.02.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
08290179.4 26 février 2008 (26.02.2008) EP

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOSTEMS LTD [IE/IE]; c/o MOP 70 Rogerson's
Quay, Dublin (IE).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
POMPIDOU, Alain [FR/BE]; 28, rue du Régent, B-1000
Bruxelles (BE). **BENHAMOU, Albert-Claude** [FR/FR];
18, rue Emile Deutsch, F-75014 Paris (FR).

(74) Mandataire : **BREESE, Pierre**; Novagraaf IP, 122, rue
Edouard Vaillant, F-92593 Levallois-Perret (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : IN VIVO MICRO-INVASIVE INVESTIGATION DEVICE INCLUDING A METAL GUIDE

(54) Titre : DISPOSITIF D'INVESTIGATION MICRO-INVASIF IN VIVO COMPRENANT UN GUIDE METALLIQUE

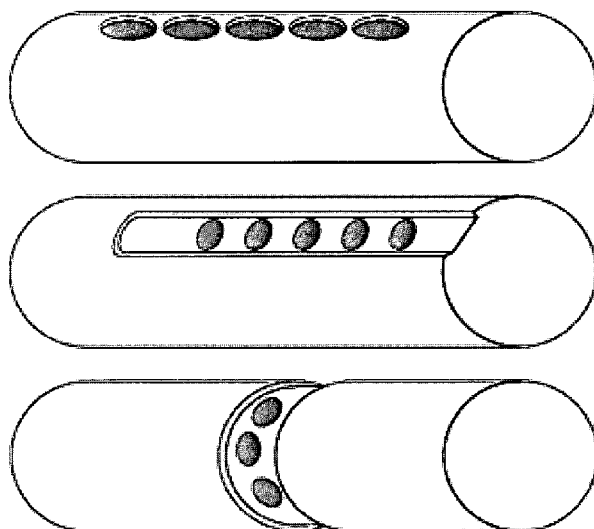


FIGURE 1

(57) Abstract : The invention relates to an analysis device,
wherein said system includes at least one metal guide at
one end of which is provided at least one series of pits to
which are directly coupled reagents specific to a substrate,
said end being a perforating one, while the other end is
intended for controlling said guide and is optionally
associated with a suction system. The guide may be
inserted into a protection system that is removable at the
level of the functionalised end, up to the micro-analysis
and/or micro-sampling site, and/or into a medical
instrument having an inner channel in which said guide
may slide. The present invention also relates to the use of
such a device for making a tool for diagnosing cancer, an
inflammation, an infection, a neurodegenerative disease or
a graft rejection in a patient, preferably by transparietal
delivery. The invention further relates to a method for the
ex vivo analysis of a substrate using such a device.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un dispositif
d'analyse, ledit système étant constitué d'au moins un guide
métallique à une extrémité duquel est pourvue au

[Suite sur la page suivante]

WO 2009/106295 A1



moins une série de puits auxquels sont directement couplés des réactifs spécifiques d'un substrat, ladite extrémité étant perforante, et dont l'autre extrémité est destinée à la manœuvre dudit guide et éventuellement associée à un système d'aspiration. Ledit guide peut est inséré dans un système de protection amovible au niveau de l'extrémité fonctionnalisée jusqu'au site de micro-analyse et/ou de micro-prélèvement, et/ou dans un instrument médical possédant une lumière interne dans laquelle ledit guide peut coulisser. La présente invention concerne également l'utilisation d'un tel dispositif pour la fabrication d'un outil destiné au diagnostic d'un cancer, d'une inflammation, d'une infection, d'une maladie neuro dégénérative ou d'un rejet de greffe chez un patient, de préférence par une administration par voie transpariétale. La présente invention concerne encore un procédé d'analyse *ex-vivo* d'un substrat utilisant un tel dispositif.

DISPOSITIF D'INVESTIGATION MICRO-INVASIF *IN VIVO*

COMPRENANT UN GUIDE MÉTALLIQUE

DESCRIPTION

5 **Domaine technique**

La présente invention concerne la fonctionnalisation d'un dispositif d'investigation transpariétal, un procédé d'analyse *ex vivo* d'un substrat utilisant un dispositif fonctionnalisé de l'invention, et l'utilisation d'un tel
10 dispositif pour la fabrication d'un outil destiné au diagnostic d'un cancer, d'une infection, d'une inflammation, d'une maladie neuro-dégénérative ou d'un rejet de greffe chez un patient.

Etat de la technique

15 Il est connu dans l'art antérieur des dispositifs d'investigation ou de traitement *in vivo*. De tels dispositifs prennent la forme d'un tube rigide de type endoscope ou d'un cathéter constitué d'un tube flexible qui est inséré dans l'organisme, notamment par les voies
20 naturelles ou les vaisseaux, et qui permet d'atteindre un organe ou un tissu spécifique. Ces dispositifs permettent notamment l'élimination de caillots de sang ou, lorsqu'ils sont associés à des fibres optiques, la visualisation et le contrôle *in vivo* de l'état d'un système, comme le tube
25 digestif, ou d'un organe, comme le colon. Le traumatisme pour le patient résultant de l'utilisation de tels dispositifs est alors minimisé mais reste encore à améliorer. Toutefois, il n'est pas toujours possible d'effectuer une analyse des organes ou des tissus chez un

patient avec ces dispositifs. Une telle impossibilité peut résulter de l'accessibilité réduite dudit tissu ou organe au regard de la circulation sanguine ou des voies naturelles, ou alors de la difficulté à effectuer un diagnostic fiable sans recourir à une étude fine des cellules dudit organe ou tissu. Dans ces cas, il est utilisé de façon courante dans l'art antérieur et à ce jour, le prélèvement d'un fragment dudit tissu ou organe (biopsies) afin de contrôler *ex vivo* la morphologie de ces tissus ou organes, ou plus finement celle des cellules qui les constituent, notamment à l'aide d'aiguilles fines (FNA ou « Fine Needle Aspiration » : Engelstein et al., Br. J. Urol., 7 : 210-213, 1994 ; Rodrigues et al., J. Am. Acad. Dermatol., 42 : 735-740, 2000 ; Ariga et al., Am. J. Surg., 184 : 410-413, 2002 ; Pérez-Guillermo et al., Diagn. Cytopathol., 32 : 315-320, 2005 ; Fernandez-Esparrach et al., Arch. Bronconeomol., 43 : 219-224, 2007). En outre, il est également possible d'analyser le statut d'expression d'un certain nombre de marqueurs dont l'expression est corrélée à un état pathologique spécifique (cancer, inflammation, infection, maladie neuro dégénérative ou rejet de greffe notamment).

Toutefois, ces différentes méthodes, du fait du prélèvement d'une biopsie ou d'aspiration de cellules *in situ*, font subir un traumatisme parfois important audit tissu ou organe et, par voie de conséquence, au patient. L'organisme de ce dernier peut ainsi être fortement éprouvé du fait d'hémorragies ou encore de la cicatrisation consécutive au prélèvement, en particulier pour certains organes (cerveau, pancréas, foie ou poumon).

Il existe donc encore aujourd'hui un besoin pour l'identification de nouvelles méthodologies d'investigations permettant d'effectuer un diagnostic fiable et précis,

notamment au regard de l'expression de marqueurs associés spécifiquement à différentes pathologies comme notamment le cancer, une inflammation, une infection ou une maladie neuro dégénérative, tout en limitant les traumatismes infligés au patient.

Le brevet EP 1 358 481 décrit un dispositif d'analyse ou de traitement *in vivo* comprenant (i) un micro-système d'investigation d'un substrat autre que par analyse d'un signal fluorescent, (ii) une tige souple à une extrémité de laquelle est fixé ledit micro-système et dont l'autre extrémité est destinée à la manœuvre dudit micro-système, (iii) un instrument médical possédant une lumière interne dans laquelle ladite tige souple peut coulisser, (iv) un système coulissant de protection du micro-système amovible au niveau du substrat, et (v) au niveau dudit micro-système, un système de dilacération de tissu ou de cellule, éventuellement associé à un ou plusieurs dispositifs choisis parmi un dispositif de surveillance à distance par des récepteurs sensoriels (tactiles, optiques, physico-chimiques et notamment électroniques ou informatiques numérisés), de réalisation de biopsie, de traitement, d'injection locale de produits biologiques ou chimiques.

Pour permettre l'effraction de vaisseaux sanguins et la dilacération de tissu ou de cellules, le micro-système est alors associé à un autre système plus rigide assurant cette fonction, de préférence en position distale.

Toutefois, dans le cas de dispositif d'investigation *in vivo*, le dispositif d'investigation est le plus souvent dirigé vers l'organe ou le tissu cible en utilisant la voie endovasculaire ou endocavitaire. Le couplage du micro-système avec un système de dilacération augmente alors de façon non négligeable le diamètre à l'extrémité du

dispositif décrit. Ce dernier se révèle alors être d'un usage complexe pour être correctement dirigé jusqu'à son site cible sans altérer simultanément les voies de circulation sanguine. Simultanément, le couplage de multiples éléments nuisent à la flexibilité d'ensemble du dispositif, et donc à son guidage correct, ainsi qu'à l'obtention de la rigidité nécessaire pour permettre la perforation d'un organe ou d'un tissu.

Description de l'invention

À la suite d'importantes recherches, l'inventeur a maintenant réussi à développer un dispositif comprenant un guide métallique à une extrémité perforante duquel sont directement couplés des groupements réactifs, notamment des anticorps ou des fragments d'anticorps, spécifiques d'un substrat à tester, et dont l'autre extrémité est destinée à la manœuvre dudit guide du site d'insertion jusqu'au site de micro-analyse et/ou de micro-prélèvement dudit substrat. Ledit guide peut être inséré dans un système de protection amovible, par exemple un cathéter souple, permettant ainsi de protéger l'extrémité fonctionnalisée dudit guide jusqu'au site de micro-analyse et/ou de micro-prélèvement du substrat à tester constitutif du tissu, de l'organe, ou des cellules de ceux-ci.

Il s'agit, conformément à la présente invention, de structurer la surface du guide dans le but de définir des endroits sur le guide, par exemple des puits, où les groupements réactifs seront déposés et où les interactions biochimiques auront lieu. Lesdits « puits » peuvent être réalisés par différents procédés comme par exemple par lithographie par faisceau d'ions focalisés (FIB ou pour « Focused Ion beam » : Xie et al., Nuclear Instruments & Methods in Physics research Section B-beam Interactions with

Materials and Atoms, 211(3) : 363-368, 2003), par lithographie par laser suivie par une attaque électrochimique et une ablation laser.

Alternativement, la structuration du guide métallique
5 peut être réalisée dans le but de définir des endroits sur ledit guide, par exemple au moins un sillon dans lequel est solidairement associée au moins une biopuce miniaturisée linéaire, circulaire ou en ruban, où les groupements réactifs seront déposés et où les réactions biochimiques
10 auront lieu. Les endroits formés par la structuration de la surface du guide, par exemple des puits, ne forment pas de relief à la surface du guide, mais des sillons, ou creux. Les endroits formés par la structuration de la surface du guide n'augmentent donc pas le diamètre du guide.

15 Avantageusement, les endroits formés par structuration de la surface du guide sont situés à la surface du guide, ce qui signifie que ces endroits sont directement en contact avec les fluides, les tissus et les cellules.

Ledit dispositif peut en outre être inséré dans un
20 instrument médical possédant une lumière interne dans laquelle ledit guide métallique peut coulisser, et notamment dans une aiguille de ponction transpariétale, notamment transcutanée ou transmuqueuse, ou un endoscope, y compris un système de navigation endovasculaire.

25 Ledit dispositif peut en outre être associé à une fibre optique, ou le guide métallique dudit dispositif peut être remplacé par une fibre optique à une extrémité perforante de laquelle est associée une bague métallique sur laquelle sont directement couplés des groupements réactifs, notamment des
30 anticorps ou des fragments d'anticorps, spécifiques d'un substrat à tester, permettant ainsi une visualisation fine

in situ, en vue de la capture *in vivo* des éléments nécessaires au diagnostic et éventuellement à l'évaluation pronostique. Les propriétés de la fibre optique sont utilisées à des fins d'imagerie de repérage et de mise en
5 place du dispositif à partir de la visualisation *in situ*.

Le dispositif selon l'invention du fait de sa simplification présente, tout en restant micro-invasif, une flexibilité ou élasticité améliorée par rapport aux dispositifs de l'art antérieur. Ce dernier peut alors être
10 utilisé bien plus efficacement pour une investigation par voie endocavitaire, notamment par voie endovasculaire, ou par voie transpariétale, notamment pas voie transcutanée ou transmuqueuse. De surcroît, le dispositif selon l'invention du fait de l'utilisation d'un guide métallique, dont une
15 extrémité est couplée à des réactifs spécifiques, présente une rigidité suffisante à son extrémité fonctionnalisée pour perforer efficacement un tissu ou un organe. Enfin, le diamètre du dispositif selon l'invention à son extrémité est suffisamment faible pour permettre une navigation simplifiée
20 dans la circulation sanguine ou dans les cavités naturelles, et surtout minimiser le traumatisme au niveau du tissu ou de l'organe que celui-ci doit perforer.

En outre, et après retrait du dispositif, il est alors possible d'identifier *ex vivo* à l'aide de techniques
25 classiques, comme un dosage immunoenzymatique ou par immunofluorescence, par exemple sur support solide [technique ELISA, puce à protéines (ESPINA *et al.*, *J. Immunol. Methods*, vol.290, p :121-133, 2004)], la présence et la concentration relative dudit ou desdits substrats
30 spécifiques à l'extrémité du dispositif selon l'invention et donc au niveau du site de micro-analyse et/ou de micro-prélèvement (organe ou tissu).

Enfin, et du fait de la nature métallique du guide, le dispositif présente un signal amélioré en imagerie (artériographie, échographie, scanner, IRM, etc...). Cette propriété permet de simplifier considérablement le
5 radioguidage du dispositif selon l'invention lors de l'intervention jusqu'au tissu ou organe ciblé. Il en est de même pour le couplage dudit dispositif avec une fibre optique à des fins d'imagerie de repérage, et qui permet la visualisation fine *in situ*.

10 En conséquence, un premier objet de l'invention est un dispositif pour l'analyse d'un substrat, caractérisé en ce qu'il comprend un système d'investigation micro-invasif et/ou de micro-prélèvement dudit substrat, ledit système étant constitué d'au moins un guide métallique à une
15 extrémité Ea duquel est pourvue au moins une série de puits auxquels est directement couplé au moins un groupement réactif spécifique dudit substrat, ladite extrémité fonctionnalisée Ea étant perforante, et dont l'autre extrémité Em est destinée à la manœuvre dudit guide
20 métallique et éventuellement associée à un système d'aspiration.

Avantageusement, la surface de l'extrémité Ea peut être structurée de manière à définir au moins une série de puits auxquels est directement couplé au moins un groupement
25 réactif spécifique dudit substrat, ladite extrémité Ea étant perforante.

Le dispositif selon l'invention, du fait du faible traumatisme qu'il engendre chez le patient, permet de réaliser plusieurs micro-analyses ou micro-prélèvements chez
30 un patient à intervalles réguliers (par exemple, analyse et/ou prélèvements étagés dans le cadre de la prostate). Lesdites analyses et/ou prélèvements successifs permettent

ainsi, outre le diagnostic, de suivre l'évolution d'un cancer, d'une inflammation, d'une infection, d'une maladie neuro dégénérative ou la bonne prise d'une greffe d'organe chez un patient.

5 Avantageusement, l'extrémité fonctionnalisée Ea peut présenter sur une longueur d'environ 0,5 à 2 cm, au moins une série de 1 à 25 puits, de préférence 2x25 puits, ayant un diamètre moyen d'environ 30 à 80 μm , de préférence d'environ 40 à 60 μm , et de manière tout à fait préférée
10 d'environ 50 μm , une profondeur d'environ 20 à 30 μm , de préférence de 25 μm , lesdits puits étant espacés les uns des autres d'environ 60 à 120 μm . De préférence, les puits ont une paroi lisse ou rugueuse, une forme ovale ou ronde, avec un fond plat ou concave.

15 Avantageusement, l'extrémité fonctionnalisée peut présenter un nombre de puits aussi élevé que possible. Le nombre de puits peut être tel que le guide métallique est d'une rigidité permettant la perforation des tissus ou organes. Dans ce mode de réalisation, le diamètre moyen de
20 l'extrémité fonctionnalisée peut être d'environ 0,3 à 3,5 mm, de préférence d'environ 0,35 mm. Avantageusement, le guide métallique peut être structuré sur une longueur de 0,5 à 2 cm, de préférence environ 1 cm, pour former des puits. Avantageusement, le diamètre des puits peut être d'environ
25 30 à 80 μm , de préférence d'environ 30 à 60 μm , par exemple 35 μm . Avantageusement, la profondeur des puits peut être d'environ 20 à 30 μm , de préférence d'environ 25 μm . L'espacement des puits peut être de 20 à 120 μm , de préférence 25 μm .

30 Avantageusement, l'extrémité fonctionnalisée Ea peut être de forme cylindrique, plane, en spirale ou modifiée de

façon à augmenter la surface des puits en contact avec les
les fluides, les tissus et les cellules.

Selon un mode de réalisation particulier du dispositif
selon l'invention, ledit dispositif comprend en outre un
5 système de protection amovible au niveau de l'extrémité
fonctionnalisée Ea.

Selon encore un mode de réalisation particulier du
dispositif selon l'invention, ledit dispositif comprend en
outre un instrument médical possédant une lumière interne
10 dans laquelle ledit au moins un guide métallique peut
coulisser.

Par « guide métallique », on entend par exemple une
tige métallique pleine souple ou une tige métallique creuse
rigide, ayant un diamètre allant de 0,2 à 3,5 mm et une
15 longueur allant de 5×10^{-2} à 2 m, et pouvant être insérée
dans un vaisseau sanguin, une petite cavité ou à travers un
organe ou un tissu, afin de pouvoir être dirigé depuis le
site d'insertion jusqu'au site de micro-analyse et/ou de
micro-prélèvement *in situ*.

20 En particulier, une tige métallique pleine souple peut
être constituée d'une fibre optique à une extrémité Ea de
laquelle est associée une bague métallique pourvue d'au
moins une série de puits auxquels est directement couplé au
moins un groupement réactif spécifique dudit substrat,
25 ladite extrémité fonctionnalisée Ea étant perforante.

Avantageusement, ladite bague métallique a une largeur
d'environ 0,5 à 2 cm, et peut présenter au moins une série
de 1 à 25 puits, de préférence 2x25 puits, ayant un diamètre
moyen d'environ 30 à 80 μm , de préférence d'environ 30 ou 40
30 à 60 μm , et de manière tout à fait préférée d'environ 50 μm
ou 35 μm , une profondeur d'environ 20 à 30 μm , de préférence

de 25 μm , lesdits puits étant espacés les uns des autres d'environ 20 à 120 μm , par exemple d'environ 60 à 120 μm . De préférence, les puits ont une paroi lisse ou rugueuse, une forme ovale ou ronde, avec un fond plat ou concave.

5 Par « guide métallique », on entend en outre une tige pleine souple ou creuse, rigide ou flexible constituée en tout ou partie d'un alliage métallique dont les caractéristiques de flexibilité, de rigidité, d'oxydation et d'immunogénicité sont compatibles avec une telle utilisation
10 chez l'être vivant et en particulier chez l'animal, et tout particulièrement chez l'homme. De tels alliages biocompatibles peuvent être identifiés simplement par l'homme du métier au regard de ses connaissances générales et comprennent notamment les aciers inoxydables, les
15 alliages à base de titane, de nickel, de cobalt, ou des mélanges de ceux-ci.

L'inventeur a pu démontrer qu'un guide à base d'un alliage de titane et de nickel (alliage de Nitinol) présentait des propriétés particulièrement intéressantes en
20 terme de flexibilité d'ensemble et de rigidité à son extrémité pour être utilisé efficacement pour les voies endovasculaires ou endocavitaires et également pour perforer efficacement un tissu ou un organe tout en minimisant le traumatisme (la taille de la perforation au niveau dudit
25 tissu ou organe est par exemple de l'ordre de 0,05 à 0,5 mm^2 , et de préférence de l'ordre de 0,07 mm^2).

Avantageusement, le guide métallique est à base d'un alliage de nickel et de titane, de préférence à base de Nitinol (guides métalliques commercialisés par la société
30 Euroflex).

Ledit guide métallique peut être recouvert, à

l'exception de l'extrémité fonctionnalisée Ea, d'un polymère hydrophile, de préférence un hydrogel, ou d'une couche polymère protectrice poreuse, ayant une épaisseur allant d'environ 0,1 à 51 μm . Avantageusement, le polymère protecteur est constitué d'un film de parylène, de TiO_2 ou d'OptoDex® (Arrayon Biotechnology, Suisse), et plus préférentiellement d'un film de parylène.

Le système de protection amovible dans lequel est inséré le guide métallique peut prendre de multiples formes, et notamment celle d'un cathéter souple, qui peuvent être déterminées simplement par l'homme du métier, par exemple des formes utilisables pour la voie endovasculaire, endocavitaire, transpariétale, et notamment transcutanée.

Ledit système de protection amovible peut être inséré par voie endovasculaire notamment pour atteindre les vaisseaux du cœur, le cerveau, le poumon, le pancréas, le rein, et le foie.

Ledit système de protection amovible peut être inséré par des accès endocavitaires, notamment par le biais d'un endoscope, par voie orale, anale, urogénitale et respiratoire, ou ORL par voie transmuqueuse, ou encore par voie transcutanée par le biais d'une ponction au niveau de la peau, pour atteindre par exemple la glande mammaire, et notamment jusqu'au rein, dans une articulation, dans le canal rachidien, par ponction lombaire ou en transpariétal dans le foie, le poumon ou le rein, mais également par voie transmuqueuse, notamment pour le tube digestif.

L'inventeur a ainsi mis en évidence que le dispositif selon l'invention permet alors d'atteindre des tissus ou organes, normalement difficiles d'accès, par les voies endovasculaire, endocavitaire ou transpariétale, et

notamment transmuqueuse ou transcutanée, utilisées classiquement.

Plus généralement, l'inventeur a mis en évidence que le dispositif selon l'invention permet du fait de ses
5 caractéristiques spécifiques de flexibilité d'ensemble et de rigidité à son extrémité d'atteindre et de perforer par voie transpariétale (transcutanée, transmuqueuse), endovasculaire ou endocavitaire certains organes et tissus appartenant au système digestif de l'oropharynx au rectum (y compris foie
10 et pancréas), au système urogénital (dont vessie, rein, prostate, testicule, ovaire et glande mammaire), au système trachéo-bronchique (dont poumon), au système ORL (dont oreille et rhinopharynx), au système ostéo-articulaire (dont cavités synoviales), au système endocrinien, au système
15 neurocérébral ou au système tégumentaire, rendant ainsi possible la réalisation de diagnostics sur des pathologies qui nécessitaient jusqu'alors la réalisation de biopsies voir des ponctions profondes agressives comme les biopsies trans-hépatiques, y compris le prélèvement de cellules par
20 aspiration à l'aide d'aiguilles fines (technique dite de « fine needle aspiration » ou FNA).

Avantageusement, ledit système de protection amovible dans lequel est inséré le guide métallique prend la forme d'un cathéter souple adapté pour la voie endovasculaire ou
25 endocavitaire.

Le dispositif selon l'invention est alors particulièrement adapté pour effectuer une investigation, par exemple, au niveau des artères et des veines, des vaisseaux du cœur, de la prostate, de la glande mammaire, du
30 pancréas, du rein, du muscle cardiaque, du système nerveux central et ses cavités ou canaux, du cerveau ou du foie.

Selon un premier mode de réalisation particulier du dispositif selon l'invention, le système de protection amovible dans lequel est inséré le guide métallique est lui-même inséré dans un endoscope. Le dispositif selon
5 l'invention est alors particulièrement adapté pour une administration par la voie endocavitaire.

Le dispositif selon l'invention est alors particulièrement adapté pour effectuer une investigation, par exemple, au niveau du système trachéo-bronchique (dont
10 poumon), du système digestif du pharynx au rectum (y compris foie et pancréas), du système urogénital (dont vessie, rein, prostate, testicule, ovaire et glande mammaire), du système ophtalmique (canaux lacrymaux), du système ORL (dont oreille et rhinopharynx), du système ostéo-articulaire, ou au niveau
15 du système nerveux central, notamment par voie endorachidienne ou de la glande mammaire par la voie endogalactophorique.

Selon un second mode de réalisation particulier du dispositif selon l'invention, le guide métallique constitué
20 d'une aiguille fine de ponction transpariétale, et notamment de ponction transcutanée ou transmuqueuse, peut être inséré dans un système de protection amovible, par exemple un cathéter souple. Le dispositif selon l'invention est alors particulièrement adapté pour une administration
25 spécifiquement par la voie transcutanée ou transmuqueuse.

Le dispositif selon l'invention est alors particulièrement adapté pour effectuer une investigation, par exemple, au niveau des téguments (peau, cuir chevelu, etc...), du sein, du rein, du poumon, du foie, du muscle, de
30 l'appareil ostéo-musculaire ou ostéo-articulaire, du système nerveux central ou périphérique, ou des glandes endocrines (notamment thyroïde, parathyroïde, surrénales, testicules,

glandes mammaires ou ovaires).

En ce qui concerne l'extrémité Ea fonctionnalisée du dispositif selon l'invention, elle est pourvue d'au moins une série de puits auxquels sont directement couplés des
5 groupements réactifs spécifiques d'un substrat à tester.

Par « groupements réactifs spécifiques », on entend par exemple une séquence d'acide nucléique [ADN (amplifié, fragment de gène, EST, SNP) ou ARN] complémentaire d'une séquence d'acide nucléique à détecter, un antigène
10 spécifique d'un anticorps à détecter ou un anticorps ou un fragment d'anticorps spécifique d'un antigène à détecter, de préférence un anticorps ou un fragment d'anticorps.

Avantageusement, lesdits groupements réactifs spécifiques sont disposés dans les micro-puits de
15 l'extrémité fonctionnalisée du dispositif selon l'invention selon une gamme croissante ou décroissante. L'homme du métier peut déterminer simplement, à l'aide de ses connaissances générales et d'expériences de routine, ladite gamme en fonction de l'affinité du groupement réactif pour
20 son substrat. À titre d'exemple, la gamme du groupement réactif est de l'ordre de 50 à 500 µg/ml, de préférence de 10 à 100 µg/ml, pour un réactif, notamment un anticorps, ayant une affinité pour son substrat, notamment un antigène, de l'ordre de 10^{-9} .

25 Par « anticorps », on entend de préférence une immunoglobuline d'être vivant, de mammifère, notamment humaine, et de manière particulièrement préférée une IgG.

Par « fragments d'anticorps », on entend des fragments d'anticorps capables de maintenir une fixation spécifique de
30 leur antigène. À titre d'exemple de tels fragments d'anticorps, on peut citer les fragments Fab, Fab', F(ab')₂.

ou Fv.

Des méthodes de couplage de réactifs, notamment de protéines sur un support métallique sont bien connues de l'homme du métier. De telles méthodes, du fait de la faible réactivité chimique des acides aminés, nécessitent en général l'activation de la surface métallique soit par des mécanismes d'oxydation, soit en recouvrant cette dernière d'au moins une couche de molécules de liaisons, le plus souvent de polymères (celle-ci peut présenter par exemple des groupements thiols, acides carboxyliques et/ou des amines). À titre d'exemple de telles méthodes, on peut citer l'adsorption sur des supports métalliques de molécules fonctionnelles s'organisant en monocouches auto-assemblées (self-assembled monolayer SAMs) et notamment les alcanethiols (voir notamment WITTSTOCK and SCHUHMANN, *Anal. Chem.*, vol.69, p :5059-5066, 1997 ; et la demande internationale WO 03/006948) ou le pyrrole (par polymérisation électrochimique de pyrrole biotinylé; DUPONT-FILLIARD et al., *Anal. Chim. Acta.*, vol.449, p :45-50, 2001).

Par couplage de l'anticorps ou du fragment d'anticorps à cette couche de molécules fonctionnelles, on entend une liaison covalente (comme des ponts disulfures entre les groupements thiols libres des alcanethiols) ou non covalente (comme une liaison streptavidine-biotine entre la biotine d'une couche de polymères d'un complexe pyrrole/biotine et la streptavidine d'un complexe streptavidine/anticorps ou fragment d'anticorps) streptavidine).

Selon un premier mode de réalisation préféré, le dispositif selon l'invention comprend au moins un guide métallique dont une extrémité Ea est couplée avec au moins un groupement réactif, de préférence un anticorps ou un

fragment d'anticorps, spécifique d'un marqueur (antigène) d'un cancer, notamment du cancer du sein, de l'ovaire, de la prostate, du colon, intra-abdominal, du rein, , du foie, du poumon, du pancréas, du système nerveux central ou
5 périphérique ou d'une glande endocrine (notamment thyroïde, testicules ou ovaires).

À titre d'exemple de marqueur du cancer du sein, on peut citer le marqueur CA 15-3 (Carcinoma-Associated Antigen 15-3 ; Duffy MJ, Shering S, Sherry F, McDermott E, O'Higgins
10 N, *Int J Biol Markers*, 2000 Oct-Dec ;15(4) : 330-3), CA 27-29 (Carcinoma-Associated Antigen 27-29 ; Kaohsiung J, *J Med Sci*, 1999 Sep ; 15(9) : 520-8), CEA (Carcinoembryonic antigen ; Soletormos G, Nielsen D, Schioler V, Mouridsen H, Dombernowsky P, *Eur J Cancer*, 2004 Mar ;40 (4) : 481-6) ;
15 TPA (Tissue Polypeptide Antigen) ; TPS (Tissue Polypeptide Specific Antigen; Given M, Scott M, Mc Grath JP, Given HF, *Breast*, 2000 Oct; 9 (5) : 277-80), HER2 (Fehm T, Jager W, Kramer S, Sohn C, Solomayer E, Wallwiener D, Gebauer G., *Anticancer Research*, 2004 May-Jun ; 24 (3b) : 1987-92), ER
20 (Estrogene Receptor ; Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M., *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004 Jul ; 51(1) : 55-67), PR (Progesterone Receptor ; Duffy MJ, *Clin Chem*, 2005 Mar ;51(3) : 494-503. Epub 2005 Jan 6.), Ki-67 (cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67 ;
25 Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J, *J Cell Biol*, 1993 Nov ; 123(3) : 513-22) et UPA (Urokinase Plasmogen Activator ; Duffy MJ, *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2001 Jun ;38(3) : 225-62).

À titre d'exemple de marqueur du cancer de l'ovaire, on
30 peut citer le marqueur CA125 (Carcinom Antigen 125; Moss EL, Hollingworth J, Reynolds TM, *J Clin Pathol*, 2005 Mar ; 58(3) : 308-12), CA 15-3 et CEA (Valenzuela P, Mateos S,

Tello E, Lopez-Bueno MJ, Garrido N, Gaspar MJ, *Eur J Gyn Oncol*, 2003 ; 24(1) : 60-2).

À titre d'exemple de marqueur du cancer de la prostate, on peut citer le marqueur PSA (Prostate-Specific Antigen; 5 Gray MA, *Clin Lab.*, 2005 ; 51(3-4) : 127-33) ; PMSA (Prostate-Specific Membrane Antigen) et AR (Androgen Receptor ; Birtle AJ, Freeman A, Masters JR, Payne HA, Harland SJ, *BJU Int*, 2005 Aug ; 96(3) : 303-7).

À titre d'exemple de marqueur du cancer du colon, on 10 peut citer le marqueur CEA (Duffy MJ, *Clin Chem*, 2001 Apr ; 47(4) : 624-30), CA 19-9 (Carcinom Antigen 19-9), CA242 (Carcinom Antigen 242), CA 72-4 (Carcinom Antigen 72-4), TPA, TPS (Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O, *Eur 15 J Cancer*, 2003 Apr ; 39 (6) : 718-27).

À titre d'exemple de marqueur du cancer intraabdominal, on peut citer le marqueur CEA ou CA 19-9 (Coban E, Samur M, Bozcuk H, Ozdogan M, *Int J Biol Markers*, 2003 Jul-Sep ; 18(3) : 177-81).

20 À titre d'exemple de marqueur du cancer du pancréas, on peut citer le marqueur TA90-IC (a 90-kDa immugenic Tumor-associated Antigen), CA-19-9 (Chung MH, Gupta RK, Bilchik AJ, Ye W, Yee R, Morton DL, *Curr Surg*, 2002 March-April ; 59(2) : 194-198), TPS, HCG beta (hCG beta , Human 25 Chorionic Gonadotropin beta), CA 72-4, CEA, CA 19-9, CA 242 (Louhimo J, Alfthan H, Stenman UH, Haglund C, *Oncology*, 2004 ; 66(2) : 126-31).

À titre d'exemple de marqueur du cancer du foie, on peut citer le marqueur alpha-foetoprotéine.

30 À titre d'exemple de marqueur du cancer du poumon, on

peut citer le marqueur Cyfra A41 (Cytokeratin fragment 41), SCC (Squamous Cell Carcinoma antigen), ACE (Angiotensin Converting Enzyme), CA 19-9, CA 125, NSE (Neuron Specific Enolase), chromogranine A, CYFRA 21-1 (Cytokeratin fragment
5 21-1) CA 15-3.

Selon un second mode de réalisation préféré, le dispositif selon l'invention comprend au moins un guide métallique dont une extrémité Ea est couplée avec au moins un réactif, de préférence un anticorps ou un fragment
10 d'anticorps, spécifique d'un marqueur spécifique d'une inflammation, notamment de l'arthrite rhumatoïde.

À titre d'exemple de marqueur de l'arthrite rhumatoïde, on peut citer notamment l'IL-1 β , l'IL-1 α , l'IL-2, l'IL-2R, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL7, l'IL8, l'IL10, l'IL12p40P70,
15 l'IL-13, l'IL-15, l'IL-17, le TNF α , l'IFN α , l'IFN γ , le GM-CSF, le MIP-1, l'IP-10, le MIG, l'Eotaxine, le RANTES et le MCP-1 (COCKRUM et al., *Lab Automation, BTi, October 2005, p :19-21*).

Selon un troisième mode de réalisation préféré, le
20 dispositif selon l'invention comprend au moins un guide métallique dont une extrémité Ea est couplée avec au moins un réactif, de préférence un anticorps ou un fragment d'anticorps, spécifique d'un marqueur spécifique d'une infection, notamment d'une infection virale, bactérienne ou
25 parasitaire.

De nombreux marqueurs infectieux sont connus de l'homme du métier et ce dernier pourra identifier sans difficulté le ou les marqueurs spécifiques associés à une infection donnée.

30 Selon un quatrième mode de réalisation préféré, le dispositif selon l'invention comprend au moins un guide

métallique dont une extrémité Ea est couplée avec au moins un réactif, de préférence un anticorps ou un fragment d'anticorps, spécifique d'un marqueur spécifique du rejet de greffe.

5 De nombreux marqueurs du rejet de greffe sont connus de l'homme du métier. À titre d'exemple, on peut citer MIP-1 β et la VE-cadhérine pour la greffe du cœur (ROUSSOULIÈRES *et al.*, *Circulation*, vol.111(20), p :2636-2644, 2005).

Au regard des marqueurs spécifiques qui sont décrits
10 précédemment, l'homme du métier au regard de ses connaissances générales pourra identifier facilement et sans expérimentation excessives les anticorps ou fragments d'anticorps spécifiques pouvant être utilisés dans le dispositif selon l'invention. À titre d'exemple, de tels
15 anticorps, on peut citer les anticorps disponibles chez TEBU ou AXXORA. L'homme du métier pourra également obtenir de tels anticorps par des méthodes d'immunisation bien connues.

De même, l'homme du métier pourra identifier sans
difficulté les acides nucléiques spécifiques adaptés pouvant
20 être utilisés dans le dispositif selon l'invention.

Selon un cinquième mode réalisation préféré, le dispositif selon l'invention comprend au moins un guide métallique dont une extrémité Ea est couplée avec au moins
25 un réactif, de préférence un anticorps ou un fragment d'anticorps, spécifique d'un marqueur spécifique ou d'un ensemble de marqueurs spécifiques de pathologies neurodégénératives, comme par exemple les Maladies d'Alzheimer(MA), le syndrome de Parkinson, la sclérose
30 latérale amyotrophique (SLA), cette liste n'étant pas limitative.

Plusieurs marqueurs sont connus et utilisés par l'homme de métier pour l'étude de ces pathologies. A titre d'exemple on peut citer pour les états démentiels ou prédémentiels, la protéine Tau totale (MAPT-Microtubule Associated Protein
5 Tau), le peptide Amyloïde ABETA1-42, les protéines Tau hyperphosphorylées (P Tau phosphorylée en 128), décrits ar exemple par Waldemar G., Dubois B., Emre M. et al, Eur.J.Neurol.,2007,14,pp 1-26 ; Dubois B.,Feldmann H.H.,Jacova C., Dekosky S.T.et al, Lancet Neurol.2007,6,pp
10 734-746;Krolak-Salmon P. et al.,Vers un diagnostique biologique de la maladie d'Alzheimer et des syndromes apparentés, La Revue de médecine interne(2008), doi:10.1016/J.revmed.2008.01.029. Ces marqueurs peuvent être dosés par une technique de dosage Antigène-Anticorps de type
15 ELISA.INNOTEST B-Amyloïd (1-42), INNOTEST hTAUAg,INNOTEST PHOSPHOTAU (181p);Innogenetics, Ghent, Belgique.

D'autres marqueurs permettent aussi de tester l'état de dégradation du cerveau et notamment la Visinin-like protein (VLP6 ou VILIP-1 ou VSNL), comme cela est décrit par exemple
20 par .Ref :Lee J.M. et al,Clin Chem,2008,54,pp 1617-1623. Ces marqueurs peuvent être utilisés dans la mise en œuvre de la présente invention.

Pour la maladie de Parkinson et les atrophies multisystématisées (synucléopathies) on peut citer le
25 marqueur, Alpha-SYNUCLEÏNE (Mollenhauer B., Cullen V., Khan I.,Experimental Neurology,2008,213,pp 315-325).

Enfin, il existe également des marqueurs non spécifiques d'affections touchant le système nerveux central(SNC), qui peuvent être utilisés dans le cadre de la présente
30 invention. Il s'agit de protéines issues du SNC telle que la protéine GFAP, la myéline, les neuropeptides et les neurotransmetteurs. La protéine BDNF (brain derived neurotrophic

factor), plus particulièrement décrite dans le document University of California San Diego Medicine & health/diseases February 200, présente un intérêt particulier 9. De plus, les protéines de la réponse
5 immunitaire, par exemple IgG, Albumine, les Protéines du complément, la Protéine C réactive, ainsi que les protéines de l'inflammation, comme par exemple Transferrine, Haptoglobine, Céruloplasmine, Lysozyme, Enolase, peuvent être utilisées dans la mise en œuvre de l'invention.

10 Quel que soit le mode de réalisation de l'invention, plusieurs marqueurs différents, c'est-à-dire des marqueurs de différentes pathologies, peuvent être placés dans des puits d'un même guide métallique. Dans ce cas, les marqueurs peuvent être placés dans des puits de manière telle que les
15 différents marqueurs n'interagissent pas les uns sur les autres.

Avantageusement, le dispositif selon l'invention, tout au moins en sa partie terminale fonctionnalisée en contact avec le substrat à analyser, présente un niveau d'assurance
20 de stérilité (SAL pour Sterility Assurance Level) de l'ordre de 10^{-6} . Différentes alternatives sont envisageables afin d'atteindre ce niveau de stérilité. Une possibilité est de stériliser le dispositif en l'absence des groupements réactifs spécifiques du substrat à détecter puis d'ajouter
25 ces derniers en conditions stériles. Une autre possibilité est de stériliser le dispositif après l'ajout des groupements réactifs, ce qui nécessite d'utiliser des techniques de stérilisation ne réduisant pas significativement l'activité desdits groupements réactifs
30 (par exemple stérilisation par l'oxyde d'éthylène ou radiation).

Un second objet de l'invention est un procédé de

détection *ex-vivo* d'un substrat présent dans un tissu ou organe, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 a) l'incubation de l'extrémité fonctionnalisée d'un dispositif selon l'invention, avec une solution comprenant au moins un agent de détection spécifique dudit substrat, après que ladite extrémité ait été mise en contact avec ledit tissu ou organe devant être examiné.

b) la détection dudit substrat.

10 L'étape d'incubation est effectuée pendant un temps suffisant pour que l'agent de détection en solution, notamment un anticorps, puisse se fixer spécifiquement au substrat (marqueur, antigène, anticorps, etc...), notamment u antigène, éventuellement présent à l'extrémité du
15 dispositif. L'homme du métier peut déterminer simplement à l'aide de ses connaissances générales et d'expériences de routine, ce temps d'incubation en fonction de l'affinité de l'agent de détection en solution, notamment un anticorps, pour son substrat, notamment un antigène. Ce temps
20 d'incubation est également fonction de la température de la solution lors de cette incubation. À titre d'exemple, le temps d'incubation est de l'ordre de 1 minute à 2 heures, de préférence de 5 minutes à 1 heure, et de manière particulièrement préférée de 10 à 30 minutes, pour une
25 température comprise entre 20°C (température ambiante) et 37°C.

Avantageusement, l'agent de détection en solution est différent du réactif spécifique couplé à l'extrémité fonctionnalisée du dispositif selon l'invention.

30 De préférence, l'agent de détection est un anticorps.

Avantageusement, l'anticorps en solution et l'anticorps couplé à l'extrémité fonctionnalisée du dispositif selon

l'invention sont chacun un anticorps polyclonal, de préférence lesdits anticorps sont identiques.

Avantageusement, l'anticorps en solution et l'anticorps couplé à l'extrémité fonctionnalisée du dispositif selon
5 l'invention sont chacun un anticorps monoclonal, de préférence lesdits anticorps sont différents.

Avantageusement, l'anticorps en solution est marqué, et notamment est couplé à une enzyme, par exemple à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline.

10 Selon un premier mode de réalisation particulier du procédé selon l'invention, le procédé comprend en outre une étape a') d'incubation de ladite extrémité dans une solution comprenant au moins un agent de détection spécifique de l'agent de détection de l'étape a), intercalée entre les
15 étapes a) et b).

L'homme du métier pourra identifier simplement et à l'aide de ses connaissances générales, les anticorps adaptés au procédé selon l'invention. À titre d'exemple, il est possible d'utiliser dans cette deuxième étape un anticorps
20 reconnaissant spécifiquement des immunoglobulines de souris, si de telles immunoglobulines de souris dirigées spécifiquement contre le substrat (marqueur, antigène, anticorps, etc...) à identifier sont utilisés à l'étape a).

Selon un second mode de réalisation particulier du
25 procédé selon l'invention, le procédé selon l'invention comprend une étape de lavage à la suite de l'étape d'incubation a), et éventuellement de l'étape a'), laquelle étape de lavage permet d'éliminer les anticorps qui ne se sont pas fixés spécifiquement au marqueur (l'antigène).

30 Le protocole d'une telle étape de lavage fait là encore

partie des connaissances générales ou peut être déterminé simplement par des expériences de routine. À titre d'exemple, une telle étape est effectuée avec une solution comprenant une concentration plus ou moins élevée de
5 détergent (de 0,05 à 1%), comme le TRITON X100® ou le TWEEN 20®, et ceci en fonction de l'affinité de l'anticorps en solution pour son antigène spécifique.

L'étape de détection est effectuée en mettant en évidence une activité, notamment enzymatique, couplée à
10 l'anticorps utilisé à l'étape a) ou, éventuellement à l'étape a').

Le protocole utilisé pour cette étape de détection est fonction du marqueur utilisé, et notamment de l'enzyme utilisée, par exemple la peroxydase et la phosphatase
15 alcaline, et fait partie des connaissances générales de l'homme du métier.

Cette étape de détection permet de déduire la quantité de substrat spécifique (par exemple d'antigène) fixé à l'extrémité fonctionnalisée du dispositif et finalement la
20 quantité de substrat spécifique présent au niveau de l'organe ou du tissu où a été effectué(e) la micro-analyse et/ou le micro-prélèvement.

Finalement, les différents groupements réactifs utilisables pour réaliser le procédé selon l'invention sont
25 bien connus de l'homme du métier et incluent, notamment, les réactifs utilisés pour la technique de dosage immunoenzymatique ou par immunofluorescence, par exemple sur support solide [technique ELISA, puce à protéines (ESPINA *et al.*, précité, 2004)].

30 Un troisième objet de l'invention consiste en l'utilisation d'un dispositif selon l'invention, pour la

fabrication d'un outil destiné au diagnostic d'un cancer, d'une inflammation, d'une infection, d'un rejet de greffe ou d'une pathologie neurodégénérative chez un patient.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, ledit outil de diagnostic peut comprendre au moins un guide métallique inséré dans un cathéter souple inséré dans un endoscope.

Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, ledit outil de diagnostic peut comprendre au moins un guide métallique consistant en une aiguille de ponction transpariétale, et notamment de ponction transcutanée ou transmuqueuse, pouvant être inséré dans un système de protection amovible, par exemple un cathéter souple. En outre, le système de protection amovible et le guide métallique coopèrent de manière à permettre la mise en contact de l'extrémité fonctionnalisée dudit guide avec le site de micro-analyse et/ou de micro-prélèvement.

Dans ces deux modes de réalisation particuliers de l'invention, ledit au moins un guide métallique peut être associé sur au moins une partie de sa longueur à une fibre optique en vue de repérage et de positionnement.

Avantageusement, ledit outil de diagnostic est administré par voie endocavitaire.

Ledit outil permet ainsi d'effectuer une micro-analyse et/ou un micro-prélèvement au niveau du système digestif du pharynx au rectum (y compris foie et pancréas), du système urogénital (dont vessie, urètre, rein, prostate), du système trachéo-bronchique (dont poumon), du système ORL (dont oreille et rhinopharynx), du système ostéo-articulaire (dont cavités synoviales).

De manière préférée, ledit outil de diagnostic est administré par voie transpariétale, notamment par voie transmuqueuse ou transcutanée.

Un tel outil de diagnostic permet ainsi d'analyser des
5 tissus ou organes difficiles à atteindre par la voie
endocavitaire ou endovasculaire utilisée habituellement. Un
tel outil de diagnostic permet ainsi d'effectuer une micro-
analyse et/ou un micro-prélèvement par voie transpariétale
au niveau de la peau, des testicules, de la prostate, de
10 l'ovaire ou des glandes mammaires, mais également du rein ou
du foie, du système nerveux périphérique ainsi que du
système nerveux central, notamment par voie endo-rachidienne
ainsi que du système endocrinien (par exemple la thyroïde).

Les exemples qui suivent permettent d'illustrer
15 l'invention et sont donnés à titre non-limitatif.

Brève description des Figures

- La Figure 1 représente différentes possibilités pour la structuration des guides métalliques.
- La Figure 2 représente des photographies de microscopie
20 électronique à balayage de différents trous réalisés
par FIB (la grande rugosité de surface due aux
inhomogénéités de gravure peut être observée).
- La Figure 3 représente une explication et une
observation de l'effet d'ombrage de la technique de
25 fraisage assistée par la fluorine.
- La Figure 4 représente la suite des opérations de microfaçonnage.
- La Figure 5 représente (a) des trous hémisphériques observés par microscope optique (b) des séries de trous

observés sur un guide à base de Nitinol par microscopie électronique à balayage (c) détail d'une cavité (d) comparaison de la rugosité de surface dans la cavité avec la rugosité de la surface du guide.

- 5 - La Figure 6 représente des photos de microscopie électronique à balayage montrant le même trou hémisphérique que dans la Figure 5 après le traitement de polissage électrochimique.
- 10 - La Figure 7 représente un schéma du dispositif de l'invention pour l'immunocapture avec un premier anticorps monoclonal (AcM 1) et la révélation de l'antigène ACE avec un second anticorps monoclonal (AcM 2).
- 15 - La Figure 8 représente les résultats d'ELISA avec l'anticorps de capture 5910 et la révélation avec l'anticorps 5909 (absorbance obtenue avec un sérum positif en antigène ACE)
- 20 - La Figure 9 représente les résultats d'ELISA avec l'anticorps de capture 5910 et la révélation avec l'anticorps 5909 (absorbance obtenue avec un sérum négatif en antigène ACE)
- 25 - La Figure 10 représente les résultats d'ELISA avec l'anticorps de capture 5905 et la révélation avec l'anticorps 5909 (absorbance obtenue avec un sérum positif en antigène ACE)
- La Figure 11 représente les résultats d'ELISA avec l'anticorps de capture 5905 et la révélation avec l'anticorps 5909 (absorbance obtenue avec un sérum négatif en antigène ACE)

- La Figure 12 représente les résultats d'ELISA des tiges plastiques rigides avec l'anticorps de capture 5910 et la révélation avec l'anticorps 5909 (absorbance obtenue avec un sérum positif en antigène ACE)

5 Ces figures sont des illustrations de la sensibilité et de la spécificité de la méthode utilisée.

EXEMPLE 1 : PREPARATION D'UN GUIDE METALLIQUE A BASE DE NITINOL ET SON ACTIVATION

La surface d'un guide métallique à base de Nitinol
10 (Euroflex) est structurée dans le but de définir des endroits, par exemple des puits, où les groupements réactifs seront déposés et où les interactions biochimiques auront lieu (Figure 1).

Lesdits « puits » peuvent être réalisés par différents
15 procédés comme par exemple par lithographie par faisceau d'ions focalisés (FIB ou pour « Focused Ion beam » : Xie et al., Nuclear Instruments & Methods in Physics research Section B-beam Interactions with Materials and Atoms, 211(3) : 363-368, 2003), par lithographie par laser suivie
20 par une gravure électrochimique et une ablation laser.

Avec la technique FIB, la machine crée un faisceau d'ions, qui est focalisé sur la surface qui doit être structurée. Sous l'action mécanique du faisceau d'ions, les atomes du matériau de surface sont éliminés de la surface.
25 Des trous d'un diamètre de 20 μm peuvent être formés avec la technique FIB dans un délai raisonnable avec un facteur de morsure de 8 $\mu\text{m}^3\text{s}^{-1}$ sous un courant de faisceau de 20 nA. La Figure 2 montre des trous de diamètres de 5, 20 et 40 μm avec une profondeur de 10 et 20 μm . La surface du fond du
30 trou est rugueuse du fait du re-dépôt du matériel pulvérisé au cours de l'attaque. Le facteur de morsure a été mesuré à

200 nm min⁻¹ sur une aire circulaire de 40 µm de diamètre et avec un courant de faisceau de 20 nA. Cela donne un facteur de morsure de 0,2 µm³ nC⁻¹ (environ 5 µm³s⁻¹), qui correspond à un temps de procédure de 20 min pour effectuer un trou de 5 20 µm de diamètre et de 20 µm de profondeur. Afin d'améliorer la rugosité de la surface, une technique de fraisage assistée par fluorine (XeF₂) a été utilisée ; une très faible rugosité de surface a alors été obtenue, mais comme la source de XeF₂ n'était pas exactement dans l'axe du 10 faisceau de gravure, un effet d'ombrage a été observé (Figure 3).

La technique de lithographie par laser et de gravure électrochimique consiste dans une première étape à recouvrir la surface avec une couche de polymère. Dans une seconde 15 étape, la couche polymère est façonnée en utilisant l'ablation laser. Dans une troisième étape, la surface est gravée en utilisant une gravure électrochimique isotrope à travers l'ouverture faite dans la couche polymère (Figure 4). La Figure 5 présente les résultats de différents tests 20 de structuration sur des guides métalliques à base de Nitinol.

Par ailleurs, les guides métalliques à base de Nitinol qui sont utilisés *in vivo* sont habituellement traités par polissage électrochimique, qui remplace la couche d'oxyde 25 natif NiTi avec une couche TiO₂ biocompatible. Les guides façonnés avec des trous sont soumis à ce procédé afin d'évaluer l'influence du procédé sur la structure des trous (Figure 6).

Une autre façon de préparer les cavités sur les 30 surfaces des guides à base de Nitinol recourt à l'ablation laser. L'utilisation de courtes impulsions laser permet l'évaporation locale du métal sans affecter le métal

environnant du fait de la chaleur générée. Les plus petites dimensions rapportées sont de l'ordre de 20 µm.

Si les trois procédés décrits ci-dessus permettent la réalisation de puits, c'est le procédé par gravure
5 électrochimique qui donne les meilleurs résultats.

**EXEMPLE 2 : TRAUMATISME CONSECUTIF A L'INSERTION IN VIVO
D'UN GUIDE METALLIQUE DANS UN ORGANE PARTICULIER**

Pour ces expériences, des micro-guides métalliques (MTI
0,012'' Silver speed) ont été utilisés, lesquels guides
10 métalliques étaient insérés dans des micro-cathéters.

Le dispositif a été introduit chez des porcs, sous anesthésie générale, au niveau d'une ponction puis au niveau du scarpa jusqu'au rein par la voie endovasculaire (via l'artère fémorale). Ce guidage a été assuré par le suivi
15 dudit dispositif dans l'artère fémorale par artériographie.

Une fois positionné à l'entrée du rein, le dispositif a été introduit dans le rein par effraction endoartérielle. Cette pénétration dans le tissu s'est faite à une profondeur de quelques millimètres et ledit dispositif y a été maintenu
20 pendant une dizaine de minutes.

Finalement, le dispositif a alors été retiré.

Les animaux ont alors été euthanasiés et les reins de ces derniers ont été prélevés pour évaluer l'état de ceux-ci après pénétration du dispositif selon l'invention.

25 Les résultats ont montré qu'aucune hémorragie importante du rein n'était associée à l'effraction. La lésion la plus importante constatée présentait une dimension de 3 x 1 mm au niveau du site d'effraction.

Le dispositif selon l'invention permet donc d'accéder à

un organe tout en étant très faiblement invasif.

EXEMPLE 3 : MICRO-TRAUMATISME CONSECUTIF A L'INSERTION DU DISPOSITIF AU NIVEAU DU FOIE

Des micro-guides métalliques (MTI 0,012'' Silver speed)
5 ont été utilisés, lesquels micro-guides métalliques étaient placés dans un fibroscope à la différence de l'exemple 1.

Le dispositif a été introduit chez des porcs, sous anesthésie générale, au niveau d'une ponction au niveau du scarpa puis jusqu'au foie par navigation endoartérielle (via
10 l'artère fémorale). Ce guidage a été assuré par le suivi dudit dispositif dans l'artère fémorale par artériographie.

Une fois positionné à proximité du foie, le dispositif a été introduit dans celui-ci. Cette pénétration dans le tissu s'est faite à une profondeur de quelques millimètres
15 et ledit dispositif y a été maintenu là encore pendant une dizaine de minutes.

Finalement, le dispositif a alors été retiré.

Comme précédemment, le prélèvement du foie après l'opération a permis de juger de l'agressivité de
20 l'intervention sur l'organe.

Aucune lésion macroscopiquement visible n'a été observée à la surface du foie. A la coupe, la présence de deux foyers hémorragiques intra-parenchymateux de siège sous-capsulaire de 1,5x0,4 cm et de 1,8x0,5 cm ont été
25 observés. Histologiquement, l'architecture hépatique est en tout point conservée avec une congestion des sinusoides, des veinules portes et des veines centrolobulaires sans aucune autre anomalie notable.

Conclusion

Les résultats ont montré que les lésions hémorragiques sont minimales : deux lésions macroscopiques mineures ont pu être observées sans aucune destruction des cellules parenchymateuses et avec une simple congestion des capillaires et des veines centro-lobulaires.

L'utilisation d'un guide métallique permet donc d'obtenir un traumatisme mineur et, dans tous les cas, largement inférieur à celui résultant d'une biopsie.

EXEMPLE 4 : ETUDE DES PARAMETRES POUR LA CONCEPTION ET LA REALISATION D'UN DISPOSITIF PERMETTANT L'IMMUNOCAPTURE ET LA DETECTION DE L'ANTIGENE ACE IN VITRO SUR SUPPORTS SOLIDES

Le dispositif utilise le principe de la technique ELISA permettant de mettre en évidence l'antigène ACE. Deux anticorps monoclonaux reconnaissant sur cet antigène des épitopes différents, ont été utilisés pour la capture (AcM1) et la révélation de l'antigène ACE (AcM2). Ces anticorps monoclonaux ayant le même isotype (IgG1), la révélation de l'antigène ACE a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal couplé à la biotine et d'un complexe streptavidine-peroxydase (Figure 7).

Deux types de support ont été utilisés, soit des plaques pour ELISA, soit des tiges plastiques rigides.

Plaques pour ELISA (Greiger)

100 µl d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène ACE (clone 5910 ou clone 5905, produits chez la souris et commercialisés par Medix Biochemical) dilué (1/5000 au 1/128000) en tampon carbonate/bicarbonate ont été

déposés par puits, et la plaque a été placée pendant 1 heure à 37°C. UN témoin négatif a été réalisée en remplaçant l'anticorps par du tampon carbonate/bicarbonate.

Après trois lavages avec 250 µl par puits de PBS les
5 sites libres de la plaque ont été saturés par 200 µl de PBS-BSA (sérum albumine bovine) 3% pendant 2 heures à 37°C.

Les puits ont ensuite été lavés trois fois par 250 µl de PBS-Tween à 0,5% avant l'ajout de 100 µl par puits d'un
sérum positif en antigène ACE dilué au 1/10, 1/100, 1/1000
10 en PBS-Tween, et la plaque a été incubée pendant 1 heure à 37°C.

Trois lavages de 250 µl par puits ont été effectués en PBS-Tween avant l'addition de 100 µl par puits d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène ACE (clone
15 5909 produit chez la souris et commercialisés par Medix Biochemical, qui diffère des précédents anticorps de capture utilisés par sa constante d'affinité et par les épitopes reconnus) biotinylé au 1/500 en PBS-Tween, et la plaque a été de nouveau incubée pendant 1 heure à 37°C.

20 Après trois lavages au PBS-Tween, 100 µl de conjugué streptavidine couplé à la peroxydase dilué au 1/2000 ont été ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 1 heure à 37°C.

Après trois lavages au PBS-Tween, la révélation a été effectuée par addition de 200 µl par puits du mélange
25 substrat (H₂O₂) et chromogène (OPD, Sigma) en tampon citrate-phosphate (pH 5).

En parallèle, la même opération a été réalisée en utilisant comme antigène, un sérum de patient « normal » (témoin négatif avec un dosage d'ACE <5 UI/ml).

La réaction a ensuite été stoppée par ajout de 50 µl d'acide sulfurique à 1M par puits. L'absorbance a été lue à 492 nm sur un lecteur de plaques (réf : ELX.800 UV).

Les résultats obtenus en utilisant l'anticorps monoclonal 5910 pour l'immunocapture (dilué au 1/500 puis de demi en demi jusqu'au 1/128000) et la révélation par l'anticorps monoclonal 5909 biotinylé sont présentés dans la Figure 8 pour le sérum positif en antigène ACE, et dans la Figure 9 pour le sérum négatif en ACE.

Les résultats obtenus en utilisant l'anticorps monoclonal 5905 pour l'immunocapture (dilué au 1/100, 1/200, 1/500 puis de demi en demi jusqu'au 1/32000) et la révélation par l'anticorps monoclonal 5909 biotinylé sont présentés dans la Figure 10 pour le sérum positif en antigène ACE, et dans la Figure 11 pour le sérum négatif en ACE.

Légendes des Figures 8 à 11 :

Ordonnée : absorbance (DO) à 492 nm

Abscisse : dilutions de l'anticorps de capture (5910 ou 5905)

◆ = dilution sérum positif en ACE au 1/10

■ = dilution sérum positif en ACE au 1/100

△ = dilution sérum positif en ACE au 1/1000

× = pas de sérum

Les résultats montrent que le sérum positif en antigène ACE au 1/10 donne une absorbance (DO) supérieure à 0,5 lorsque l'anticorps monoclonal de capture est utilisé au 1/500 (Figure 8). Dans les mêmes conditions, le sérum

1 négatif en antigène ACE donne une DO inférieure à 0,15 (Figure 9).

5 Toutefois, il est à noter que de meilleurs résultats ont été obtenus avec le couple anticorps monoclonal 5905 de capture et anticorps monoclonal 5909 de détection (Figures 10 et 11) qu'avec le couple anticorps monoclonal 5910 de capture et anticorps monoclonal 5909 de détection (Figures 8 et 9). En effet, une DO de 1 a été observée avec le sérum positif en antigène ACE dilué au 1/10 (Figure 10) alors que
10 le sérum négatif en antigène ACE donne dans les mêmes conditions une DO de 0,1 (Figure 11). Ces résultats ont été confirmés en utilisant l'anticorps monoclonal 5910 de capture à différentes dilutions (données non représentées).

Supports plastiques rigides

15 Dans une première étape, des supports plastiques rigides sous la forme de tiges de 2 à 3 cm de longueur et de 0,5 à 1 mm de diamètre ont été activés.

Dans une seconde étape, les supports ainsi activés ont été placés dans des microtubes à hémolyse de 1 ml (Fisher)
20 et ont été fonctionnalisés avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène ACE (clone 5910 produit chez la souris et commercialisé par Medix Biochemical) et dilué au 1/50, 1/100, 1/250, 1/500 en tampon carbonate/bicarbonate (250 µl/tube) pendant 1 heure à 37°C. Un témoin négatif a
25 été réalisé en remplaçant l'anticorps monoclonal par du tampon carbonate/bicarbonate. Après fixation et lavages, la saturation a été effectuée avec 500 µl de PBS-BSA 3% pendant une nuit à +4°C.

Les supports ont ensuite été incubés avec 250 µl de
30 sérum positif en antigène ACE dilué au 1/10, 1/100 en PBS ou

avec du sérum d'un sujet « sain » (témoin négatif en antigène ACE) à la même dilution pendant 1 heure à 37°C.

Un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène ACE (clone 5909 produit chez la souris et commercialisé par Medix Biochemical, qui diffère du clone 5910 par sa constante d'affinité et par les épitopes reconnus) purifié, à 1 mg/ml, a été dialysé une nuit à 4°C contre du tampon borate 0,1 M pH 8,8. Une solution de biotine à 10 mg/ml en DMSO a alors été ajoutée à raison de 50 µg/mg d'anticorps. Après incubation de 4 heures à température ambiante et sous agitation, du chlorure d'ammonium 1 M a été ajouté, à raison de 20 µl/ 250 µg de biotine, et la solution obtenue a été de nouveau incubée durant 1 minute à température ambiante. Après blocage de la réaction, l'anticorps marqué a été dialysé 24 heures à +4°C contre du PBS et cet anticorps marqué a été conservé sous forme d'aliquotes à -20°C.

Après 3 lavages en PBS-Tween, les supports ont été incubés avec 250 µl de l'anticorps 5909 biotinylé et dilué au 1/500 en PBS-Tween pendant 1 heure à 37°C.

La détection de la biotine (ester de l'acide 6-biotinamidocaproylamido-caproïque et de N-hydroxysuccinimide, Sigma) a été mise en évidence à l'aide d'un complexe streptavidine-peroxydase (Amersham Biosciences) dilué au 1/2000 en PBS pendant 1 heure à 37°C.

La révélation de l'activité enzymatique a été réalisée par addition de 750 µl par tube du mélange substrat (H₂O₂) et chromogène (OPD, Sigma) en tampon citrate-phosphate (pH 5).

La réaction a ensuite été stoppée par ajout d'acide sulfurique à 1M. L'absorbance a été lue à 492 nm.

Les résultats d'ELISA sur tiges plastiques sont présentés dans la Figure 12.

Légendes de la Figure 12 :

Ordonnée : absorbance (DO) à 492 nm

5 Abscisse : dilutions de l'anticorps 5910 de capture

◆ = dilution antigène ACE au 1/10

■ = dilution antigène ACE au 1/100

△ = dilution témoin négatif au 1/10

× = dilution témoin négatif au 1/100

10 En général, les résultats montrent que les DO sont 7 à 10 fois plus élevées avec le sérum positif en antigène ACE que celles obtenues avec le sérum négatif en antigène ACE.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les supports plastiques rigides sur lesquels ont été fixés
15 l'anticorps monoclonal 5910 de capture dilué au 1/50 ou au 1/100.

La concentration en antigène ACE ayant été la mieux détectée, correspond au sérum du patient dilué au 1/100 soit à 6 UI/ml (proche du taux considéré comme « normal » :
20 < 5UI/ml) et lorsque la dilution de l'anticorps monoclonal 5909 de détection est au 1/500.

L'utilisation des supports plastiques permet de valider la spécificité et la sensibilité des processus d'immunocapture sur tige métallique fonctionnalisée selon le
25 protocole décrit précédemment.

Conclusion

Les bons résultats obtenus pour la détection de l'antigène ACE avec les techniques d'immunocapture et de révélation *in vitro*, valident l'évaluation des dispositifs « tiges fonctionnalisées » permettant la capture *in vivo* de l'antigène ACE suivie d'une révélation *ex vivo*.

EXEMPLE 5 : IDENTIFICATION DE L'EXPRESSION DU MARQUEUR ACE DANS UNE TUMEUR DU SEIN PAR EXEMPLE SOUS CONTROLE DE TECHNIQUES D'IMAGERIE, NOTAMMENT RADIOLOGIQUES

Selon le protocole décrit dans la demande PCT WO 03/006948, dans une première étape, une couche d'alcanethiol est adsorbée sur l'une des extrémités de guides métalliques à base de Nitinol (Euroflex) dans une première étape. Dans une seconde étape, les fonctions thiol libres de cette couche permettent la formation de ponts disulfures avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène ACE.

Le guide métallique obtenu est alors introduit dans une aiguille à biopsie adaptée en vue de son utilisation chez l'animal ou chez l'être humain.

Un examen anatomopathologique extemporané est réalisé à l'aide de ce dispositif sur une pièce opératoire (tumeur mammaire), après son retrait chez une patiente souffrant d'un cancer du sein. Alternativement, lorsque les conditions éthiques médicales sont réunies, une micro-incision au niveau du sein est réalisée sous anesthésie locale ou générale chez une patiente souffrant d'un cancer du sein. L'aiguille, dans laquelle est inséré le guide métallique couplé à l'anticorps dirigé contre l'antigène ACE, est introduite dans la tumeur ou par la micro-incision puis dirigée jusqu'à la tumeur en suivant sa progression par imagerie, et notamment par échographie.

Ledit système de guidage micro-invasif permet alors de sortir l'extrémité du guide métallique couplée à l'anticorps dirigé contre l'antigène ACE. L'extrémité du guide métallique est alors introduite dans la tumeur (par perforation) à une profondeur de l'ordre de quelques millimètres. Après un faible temps d'attente, de l'ordre d'une dizaine de minutes, qui permet l'immunocapture de l'antigène ACE éventuellement exprimé par la tumeur, le dispositif est retiré.

Le micro-prélèvement se limite à une immunocapture de l'analyte *in vivo* et ne nécessite pas de biopsie.

Finalement, le dispositif est retiré puis un dosage ELISA du marqueur ACE est réalisé sur l'extrémité du dispositif avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène ACE qui se différencie de l'anticorps de capture par sa constante d'affinité vis-à-vis de l'antigène ACE et par les épitopes reconnus, et qui est couplé à la biotine.

La révélation de l'activité enzymatique à l'aide d'un complexe streptavidine-peroxydase permet de conclure à l'expression du marqueur ACE par la tumeur et de moduler en conséquence la thérapie à utiliser pour traiter au mieux la patiente.

EXEMPLE 6 : CANCER CUTANE

Selon le protocole décrit dans la demande PCT WO 03/006948, une couche d'alcanethiol a été adsorbée sur l'extrémité d'un guide métallique à base de Nitinol (Euroflex) dans une première étape. Dans une seconde étape, les fonctions thiols libres de cette couche ont permis la formation de ponts disulfures avec un anticorps monoclonal dirigé contre le marqueur FAP (Fibroblast-activation protein ; RETTIG *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.85,

p :3110, 1988).

Le guide métallique obtenu est alors introduit au niveau d'une tumeur cutanée chez l'animal ou chez l'homme lorsque les conditions éthiques médicales sont réunies, ou
5 encore au niveau d'une tumeur cutanée chez un patient souffrant d'un cancer de la peau après son ablation pour un examen anatomopathologique classique ou extemporané.

Le micro-prélèvement se limite à une immunocapture *in vivo* et ne nécessite là encore pas de biopsie spécifique.

10 Finalement, le dispositif est retiré et un dosage ELISA du marqueur FAP est réalisé sur l'extrémité du dispositif avec un anticorps monoclonal dirigé contre le marqueur FAP couplé à la peroxydase.

La révélation de l'activité peroxydase permet de
15 conclure à l'expression du marqueur FAP par la tumeur et de moduler en conséquence la thérapie à utiliser pour traiter au mieux le patient.

REVENDICATIONS

1) Dispositif d'analyse, caractérisé en ce qu'il comprend un système d'investigation micro-invasif et/ou de
5 micro-prélèvement d'un substrat, ledit système étant constitué d'au moins un guide métallique comportant :

- une extrémité Ea dont la surface est structurée de manière à définir au moins une série de puits auxquels est directement couplé au moins un groupement
10 réactif spécifique dudit substrat, ladite extrémité Ea étant perforante, et

- et une autre extrémité Em, destinée à la manœuvre dudit guide métallique.

15 2) Dispositif selon la revendication 1 comprenant en outre un système de protection amovible au niveau de l'extrémité Ea.

3) Dispositif selon la revendication 2, dans
20 lequel ledit système de protection amovible est un cathéter souple.

4) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 comprenant en outre un instrument
25 médical possédant une lumière interne dans laquelle ledit au moins un guide métallique peut coulisser.

5) Dispositif selon la revendication 4, dans lequel ledit instrument médical est choisi dans le groupe
30 comprenant une aiguille de ponction transpariétale, et/ou un endoscope, y compris un système de navigation endovasculaire.

6) Dispositif selon la revendication 5, dans

lequel ladite aiguille de ponction transpariétale est une aiguille de ponction transcutanée ou transmuqueuse.

7) Dispositif selon l'une quelconque des
5 revendications 1 à 6, dans lequel ledit au moins un guide métallique est choisi dans le groupe comprenant une ou plusieurs tiges métalliques pleines souples et/ou une ou plusieurs tiges métalliques creuses rigides, ayant un diamètre allant de 0,3 à 3,5 mm et une longueur allant de
10 5×10^{-2} à 2 m.

8) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel ledit au moins un guide métallique est associé sur au moins une partie de sa
15 longueur à un système de visualisation.

9) Dispositif selon la revendication 8, dans lequel le système de visualisation est une fibre optique.

20 10) Dispositif selon la revendication 7, dans lequel ladite au moins une tige métallique pleine souple est une fibre optique à une extrémité Ea de laquelle est associée une bague métallique pourvue d'au moins une série de puits auxquels est directement couplé au moins un
25 groupement réactif spécifique dudit substrat, ladite extrémité Ea étant perforante.

11) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans lequel ledit au moins un guide
30 métallique est constitué en tout ou partie d'un alliage métallique choisi dans le groupe comprenant des aciers inoxydables, des alliages à base de titane, de nickel, de cobalt, ou d'un mélange de ceux-ci.

12) Dispositif selon la revendication 11, dans lequel ledit guide métallique est constitué en tout ou partie d'un alliage de titane et de nickel.

5 13) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans lequel ledit au moins un guide métallique est recouvert, à l'exception de l'extrémité Ea, d'une couche polymère protectrice ayant une épaisseur allant de 2×10^{-3} à 1 μm .

10

 14) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans lequel ledit au moins un groupement réactif est spécifique d'un substrat ou antigène spécifique du cancer, d'une inflammation, d'une infection,
15 d'un rejet de greffe, ou d'une pathologie neurodégénérative.

 15) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, dans lequel ledit au moins un groupement réactif spécifique d'un substrat est un anticorps
20 ou un fragment d'anticorps choisi dans le groupe constitué des fragments Fab, Fab', F(ab')₂ et Fv.

 16) Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour la fabrication
25 d'un outil destiné au diagnostic d'un cancer, d'une inflammation, d'une infection d'un rejet de greffe ou d'une pathologie neurodégénérative, comme les maladies d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, ou la sclérose latérale amyotrophique.

30

 17) Utilisation selon la revendication 16, dans laquelle ledit outil comprend au moins un guide métallique inséré dans un cathéter souple inséré dans un endoscope, et est destiné au diagnostic d'un cancer, d'une inflammation,

d'une infection d'un rejet de greffe ou d'une pathologie neurodégénérative.

18) Utilisation selon la revendication 16, dans
5 laquelle ledit outil comprend au moins un guide métallique constitué d'une aiguille de ponction transpariétale et inséré dans un cathéter souple, et est destiné au diagnostic d'un cancer, d'une inflammation, d'une infection, d'un rejet de greffe ou d'une pathologie neurodégénérative.

10

19) Utilisation selon la revendication 18, dans laquelle ledit au moins un guide métallique et le cathéter souple coopèrent ensemble de manière à mettre en contact l'extrémité fonctionnalisée Ea avec le site de micro-analyse
15 et/ou de micro-prélèvement.

20) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, dans laquelle la voie transpariétale est choisie dans le groupe constitué des voies transmuqueuse
20 et transcutanée.

21) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, dans laquelle ledit au moins un guide métallique est associé sur au moins une partie de sa
25 longueur à une fibre optique.

22) Procédé de détection *ex-vivo* d'un substrat présent dans un tissu ou organe, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

30 a) l'incubation de l'extrémité fonctionnalisée Ea d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, avec une solution comprenant au moins un agent de détection spécifique dudit substrat, après que ladite extrémité ait été mise en contact avec ledit tissu ou organe

devant être examiné.

b) la détection dudit substrat.

23) Procédé selon la revendication 22, dans
5 lequel ledit au moins un agent de détection de l'étape a)
est un anticorps éventuellement marqué spécifique dudit
substrat.

24) Procédé selon l'une quelconque des
10 revendications 22 ou 23, dans lequel est intercalé entre les
étapes a) et b), une étape a') d'incubation de ladite
extrémité dans une solution comprenant au moins un agent de
détection spécifique de l'agent de détection de l'étape a).

15 25) Procédé selon la revendication 24, dans
lequel ledit au moins un agent de détection de l'étape a')
est un anticorps marqué spécifique de l'agent de détection
de l'étape a).

20 26) Procédé selon l'une quelconque des
revendications 22 ou 23, dans lequel une étape de lavage
suit l'étape a).

25 27) Procédé selon l'une quelconque des
revendications 24 ou 25, dans lequel une étape de lavage
suit l'étape a) et/ou l'étape a').

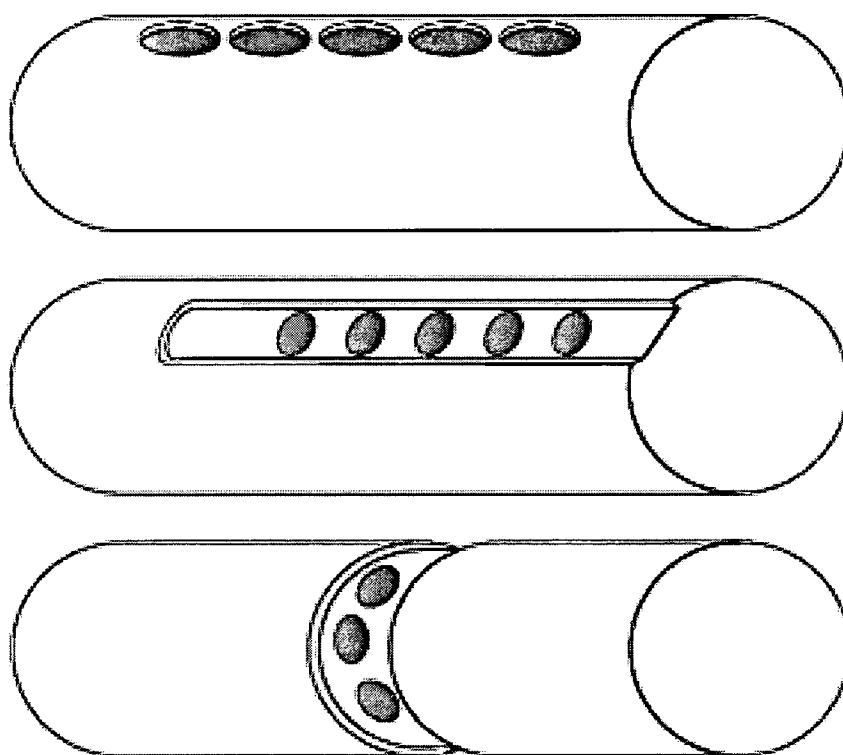


FIGURE 1

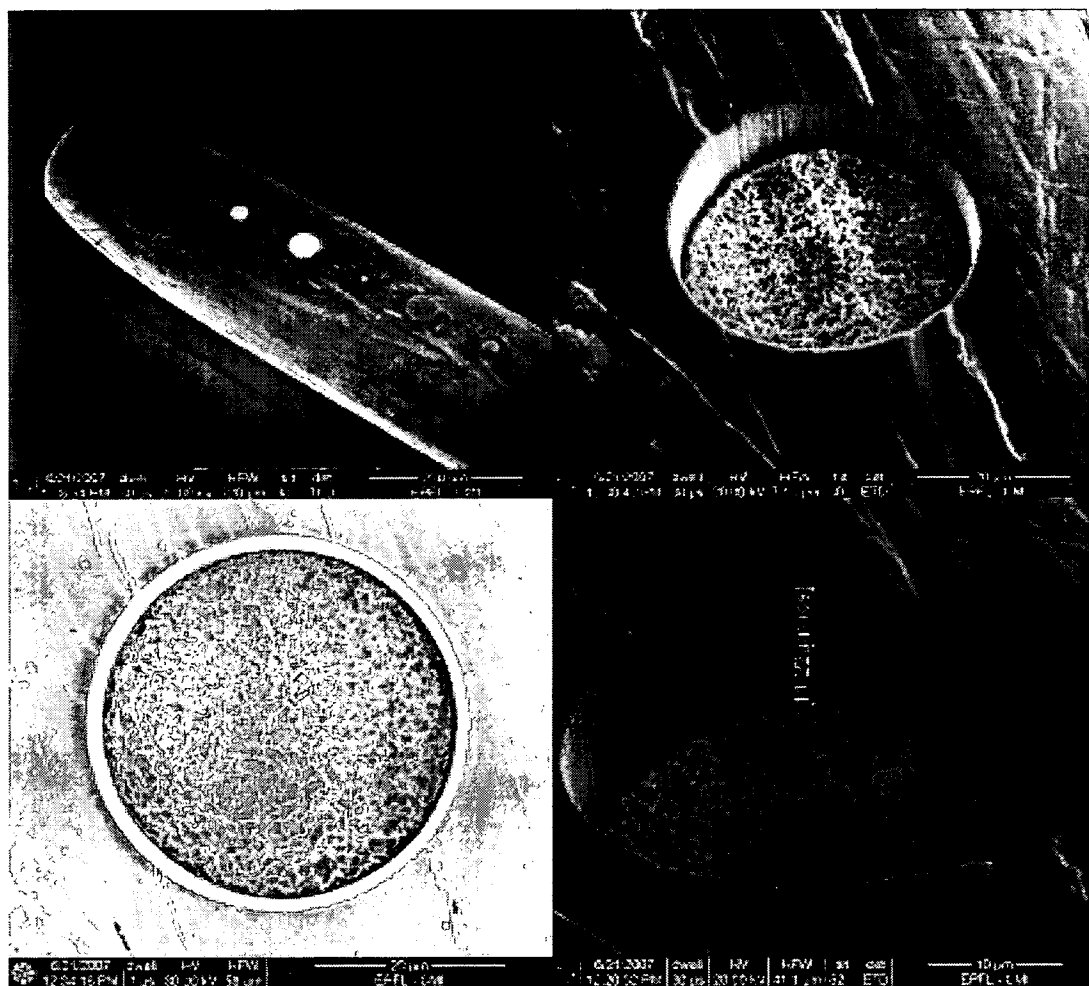


FIGURE 2

3/10

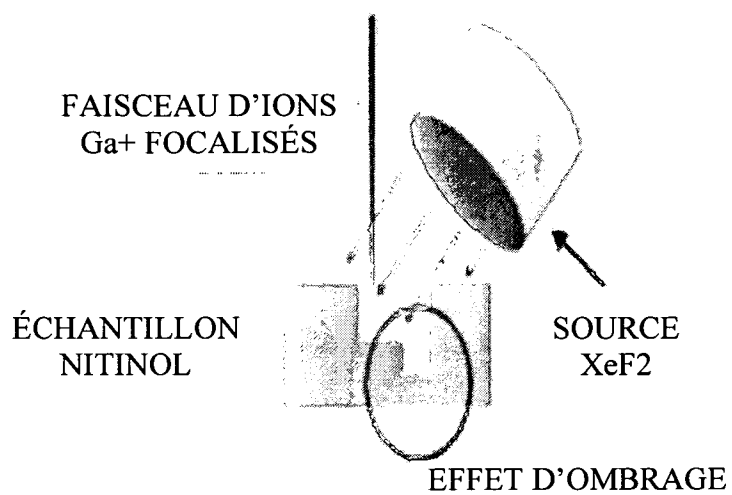


FIGURE 3

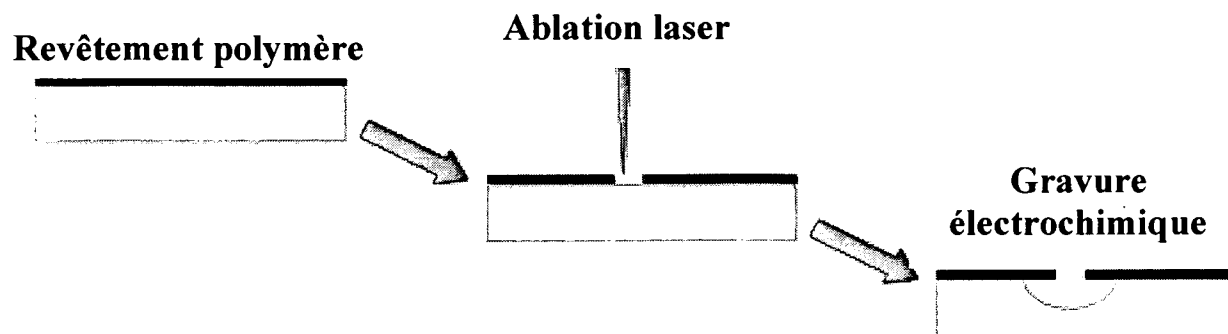


FIGURE 4

4/10

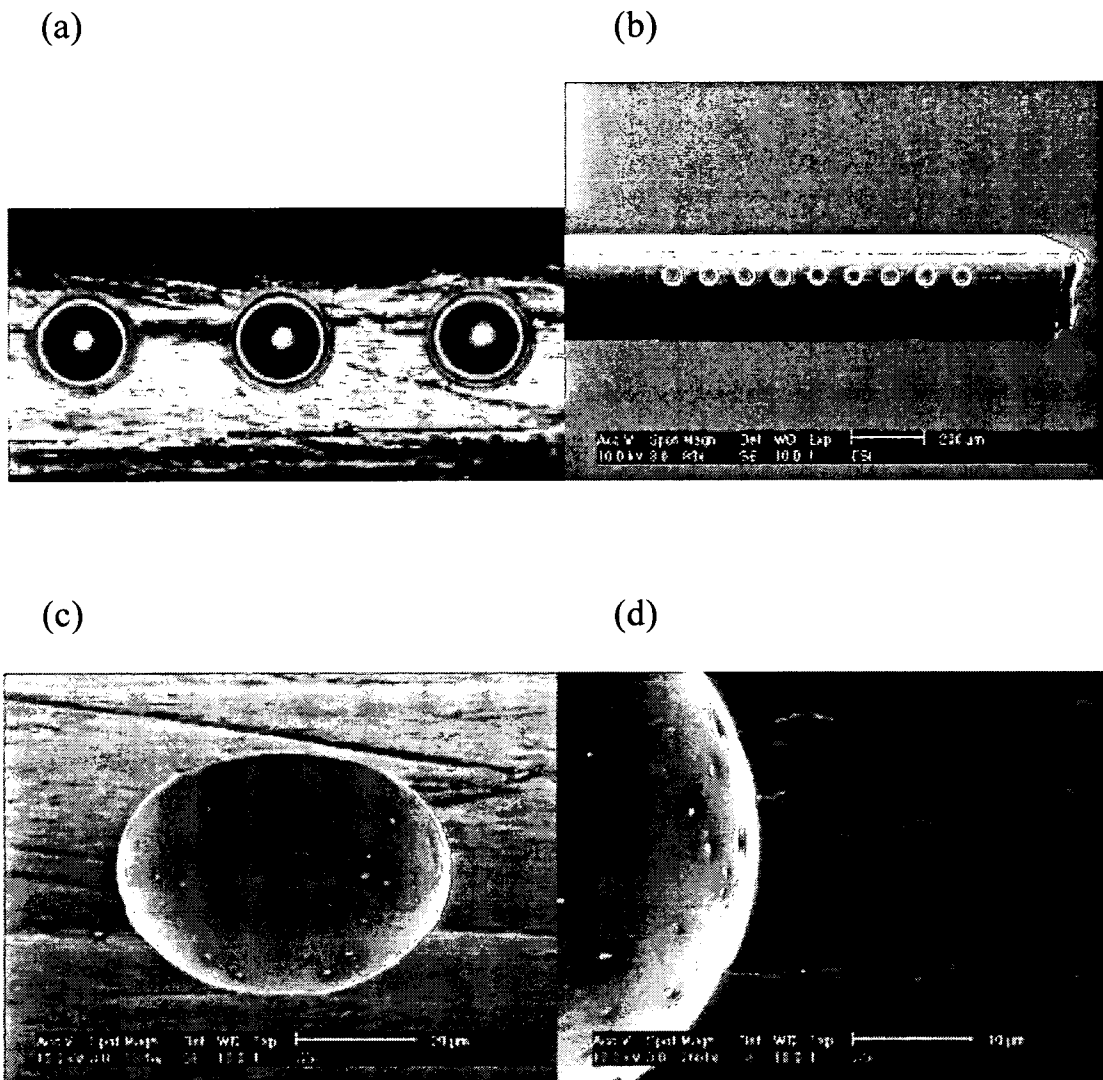


FIGURE 5

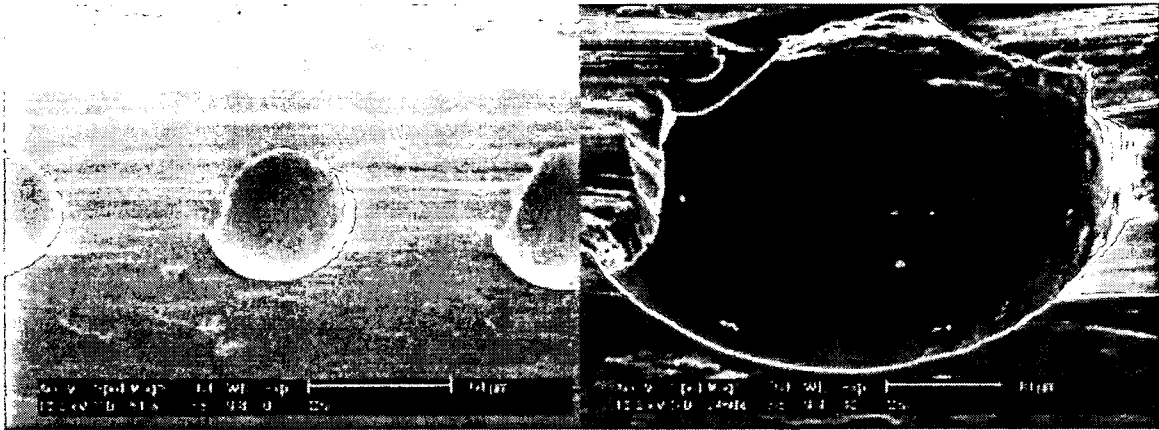


FIGURE 6

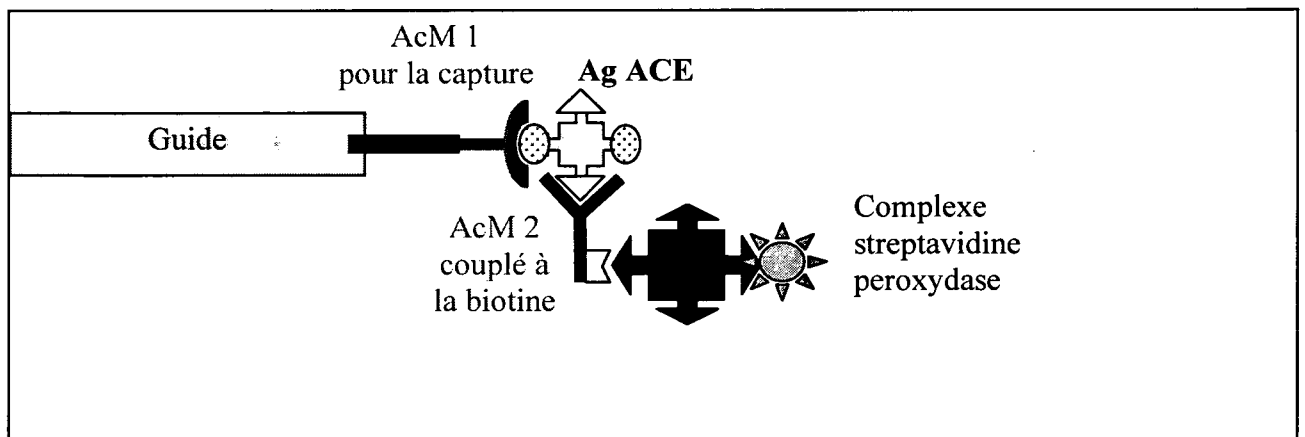


FIGURE 7

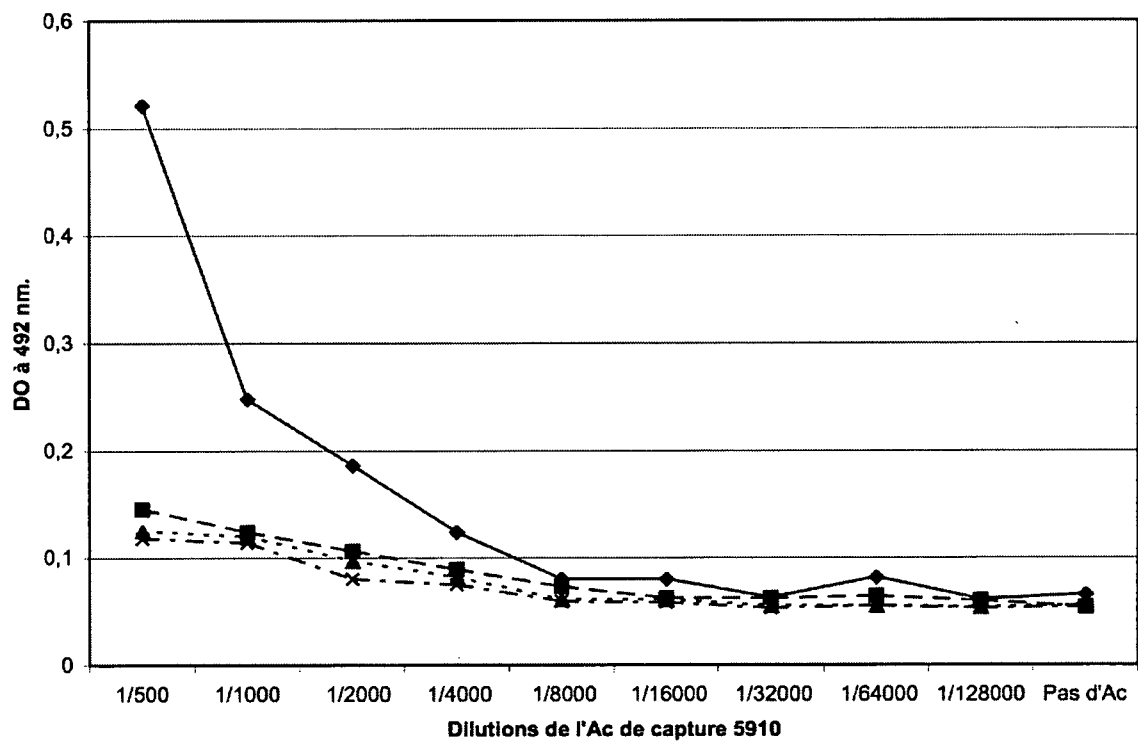


FIGURE 8

7/10

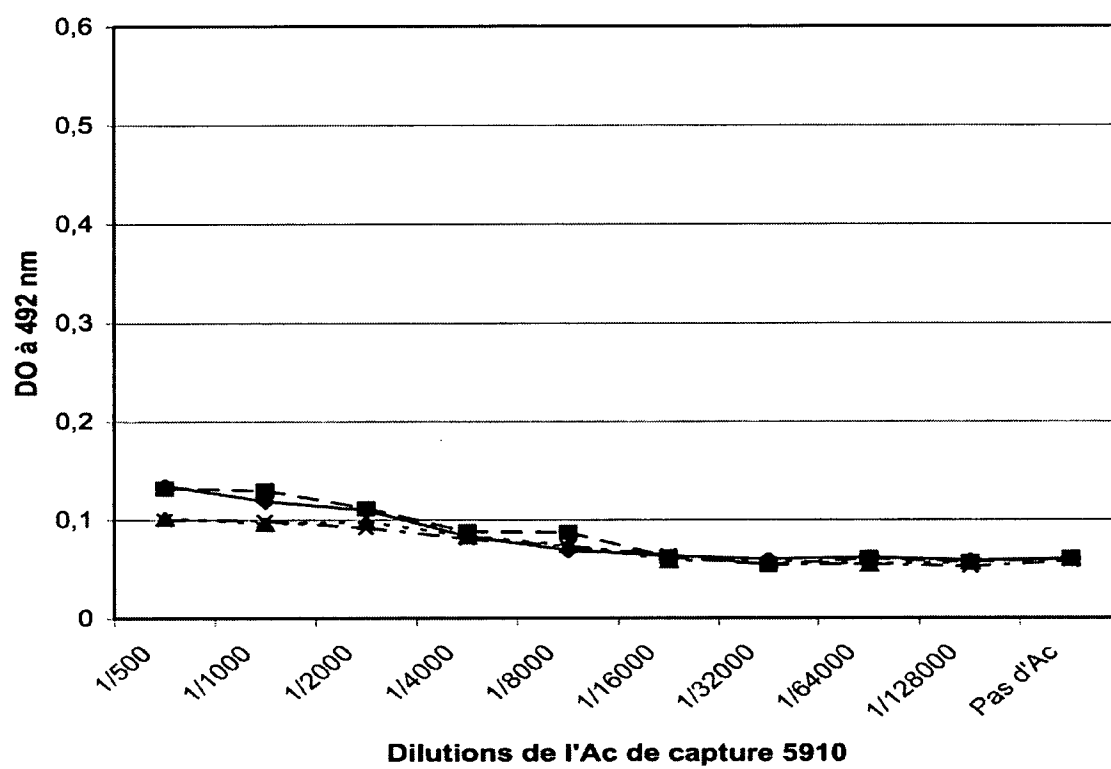


FIGURE 9

8/10

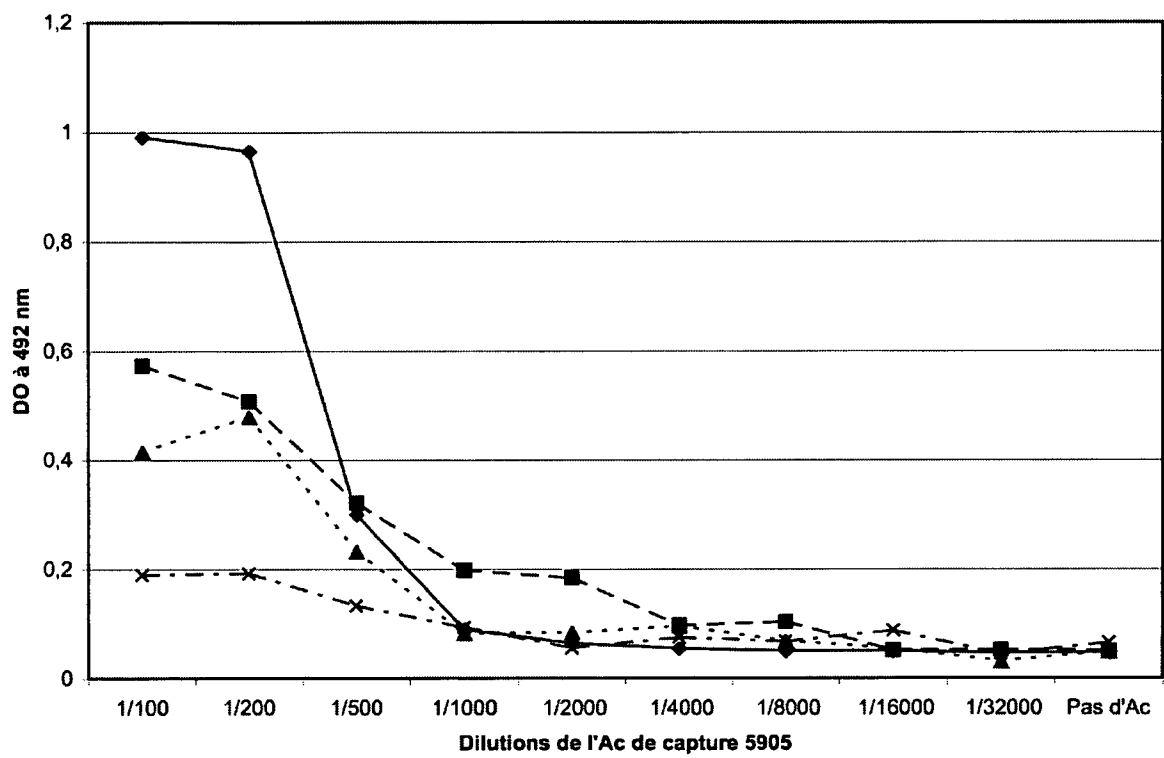


FIGURE 10

9/10

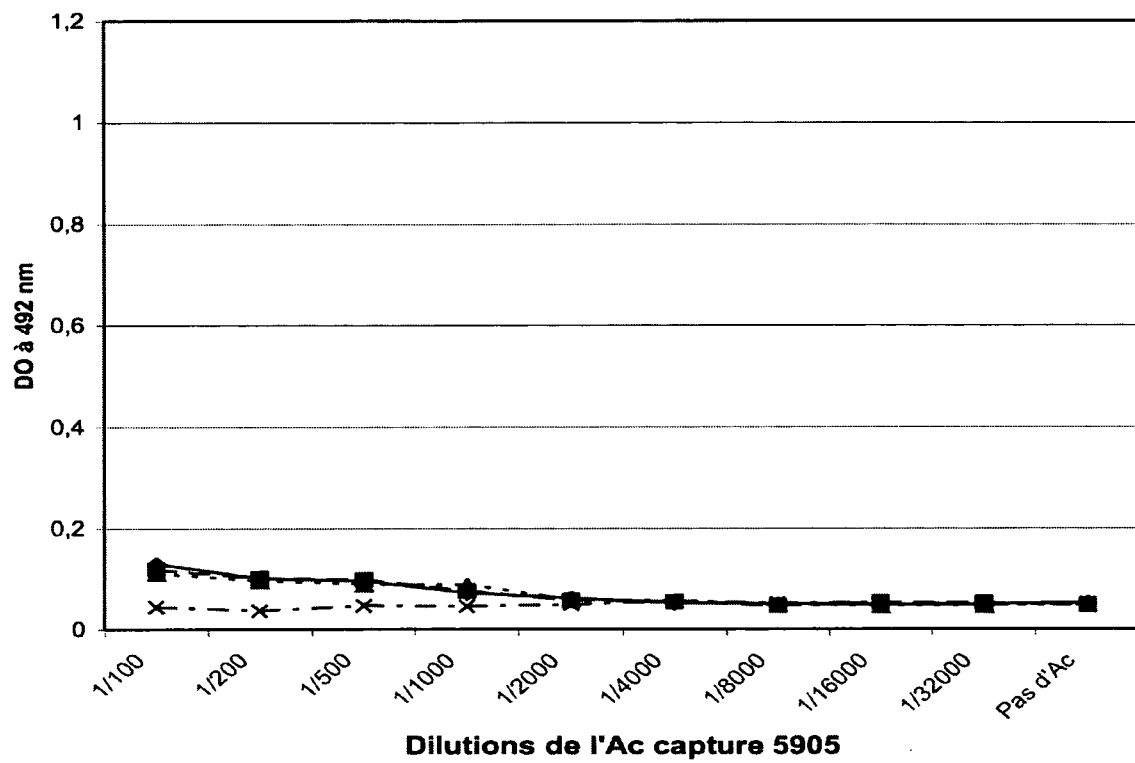


FIGURE 11

10/10

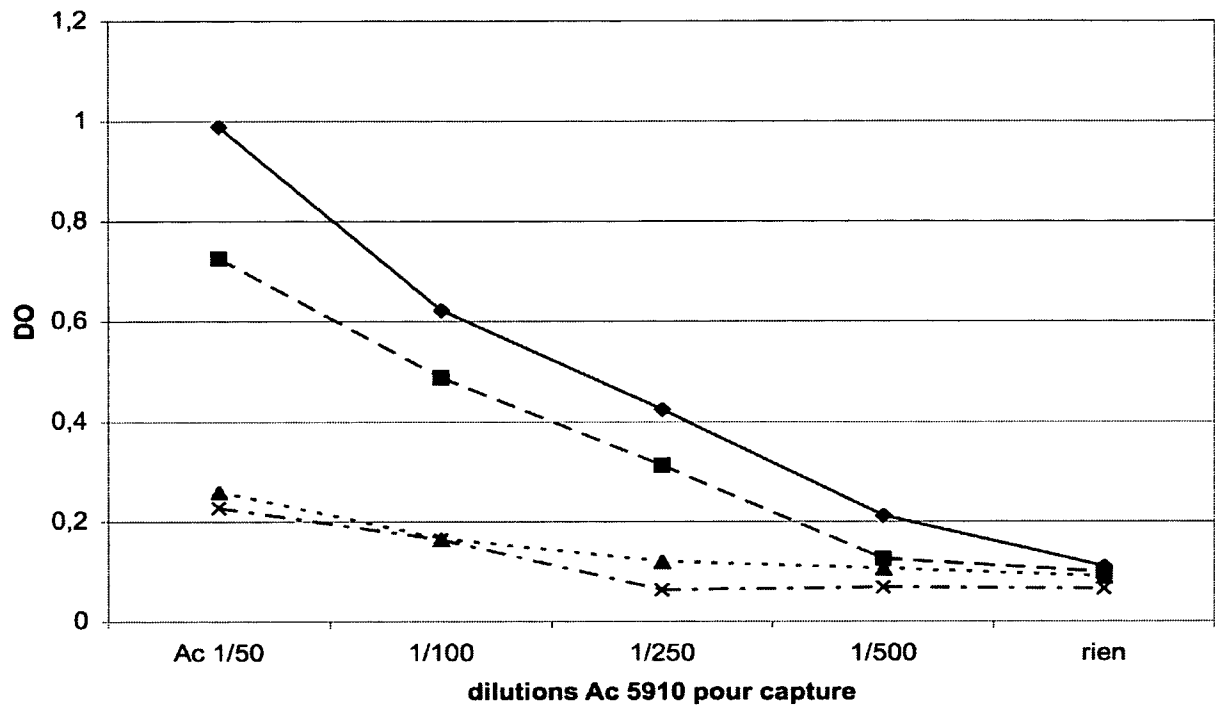


FIGURE 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/001308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61B5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 1 358 481 B1 (POMPIDOU ALAIN [FR]; BENHAMOU ALBERT-CLAUDE [FR]) 30 June 2004 (2004-06-30) cited in the application paragraphs [0011], [0012], [0015], [0018], [0019], [0037] - [0040]	1-21
Y	EP 0 234 928 A (LILLY CO ELI [US]) 2 September 1987 (1987-09-02) column 2, lines 2-14 column 2, lines 24-46 column 2, line 60 - column 3, line 1 column 4, lines 26-46 column 7, lines 53-60 ----- -/--	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 mars 2009

Date of mailing of the international search report

20/04/2009

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Martelli, Luca

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/001308

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 7 291 497 B2 (HOLMES ELIZABETH A [US] ET AL) 6 November 2007 (2007-11-06) column 8, lines 41-44 column 11, line 30 - column 12, line 3 column 13, lines 41-56 -----	1-13
A	US 5 938 595 A (GLASS ROBERT S [US] ET AL) 17 August 1999 (1999-08-17) column 2, lines 51-60 - column 3, lines 25-33 -----	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/001308

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 22-27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
PCT Rule 39.1(iv) - Method for treatment of the human or animal body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/001308

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1358481	B1	30-06-2004	AT 270433 T	15-07-2004
			AU 4660801 A	24-09-2001
			DE 60104149 D1	05-08-2004
			DE 60104149 T2	18-08-2005
			EP 1358481 A2	05-11-2003
			ES 2223814 T3	01-03-2005
			WO 0169257 A2	20-09-2001
			PT 1358481 E	30-11-2004
			TR 200402421 T4	21-12-2004
EP 0234928	A	02-09-1987	AU 594747 B2	15-03-1990
			AU 6929287 A	03-09-1987
			BR 8700936 A	29-12-1987
			CN 87100936 A	23-09-1987
			DK 96887 A	28-08-1987
			EG 17952 A	30-11-1991
			HU 44859 A2	28-04-1988
			IL 81645 A	10-03-1991
			IN 168318 A1	09-03-1991
			JP 62218844 A	26-09-1987
			NZ 219387 A	06-01-1989
			PH 24081 A	05-03-1990
			PT 84347 A	01-03-1987
			SU 1484305 A3	30-05-1989
			US 4710623 A	01-12-1987
			ZA 8701300 A	28-09-1988
US 7291497	B2	06-11-2007	US 2006182738 A1	17-08-2006
			US 2006062852 A1	23-03-2006
			US 2005100937 A1	12-05-2005
US 5938595	A	17-08-1999	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2009/001308

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61B5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A61B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 1 358 481 B1 (POMPIDOU ALAIN [FR]; BENHAMOU ALBERT-CLAUDE [FR]) 30 juin 2004 (2004-06-30) cité dans la demande alinéas [0011], [0012], [0015], [0018], [0019], [0037] - [0040]	1-21
Y	EP 0 234 928 A (LILLY CO ELI [US]) 2 septembre 1987 (1987-09-02) colonne 2, ligne 2-14 colonne 2, ligne 24-46 colonne 2, ligne 60 - colonne 3, ligne 1 colonne 4, ligne 26-46 colonne 7, ligne 53-60 ----- -/--	1-21

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 mars 2009

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/04/2009

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Martelli, Luca

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2009/001308

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 7 291 497 B2 (HOLMES ELIZABETH A [US] ET AL) 6 novembre 2007 (2007-11-06) colonne 8, ligne 41-44 colonne 11, ligne 30 - colonne 12, ligne 3 colonne 13, ligne 41-56 -----	1-13
A	US 5 938 595 A (GLASS ROBERT S [US] ET AL) 17 août 1999 (1999-08-17) colonne 2, ligne 51-60 - colonne 3, ligne 25-33 -----	1-21

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2009/001308

Cadre n°. II Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes :

1. ☒ Les revendications n°s 22-27 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :
Règle 39.1(iv) PCT - Méthode de traitement chirurgical du corps humain ou animal
2. ☐ Les revendications n°s parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier :
3. ☐ Les revendications n°s parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre n°. III Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s:
4. ☐ Aucune taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s:

Remarque quant à la réserve ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.

☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.

☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2009/001308

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1358481	B1	30-06-2004	AT 270433 T	15-07-2004
			AU 4660801 A	24-09-2001
			DE 60104149 D1	05-08-2004
			DE 60104149 T2	18-08-2005
			EP 1358481 A2	05-11-2003
			ES 2223814 T3	01-03-2005
			WO 0169257 A2	20-09-2001
			PT 1358481 E	30-11-2004
			TR 200402421 T4	21-12-2004
EP 0234928	A	02-09-1987	AU 594747 B2	15-03-1990
			AU 6929287 A	03-09-1987
			BR 8700936 A	29-12-1987
			CN 87100936 A	23-09-1987
			DK 96887 A	28-08-1987
			EG 17952 A	30-11-1991
			HU 44859 A2	28-04-1988
			IL 81645 A	10-03-1991
			IN 168318 A1	09-03-1991
			JP 62218844 A	26-09-1987
			NZ 219387 A	06-01-1989
			PH 24081 A	05-03-1990
			PT 84347 A	01-03-1987
			SU 1484305 A3	30-05-1989
			US 4710623 A	01-12-1987
			ZA 8701300 A	28-09-1988
US 7291497	B2	06-11-2007	US 2006182738 A1	17-08-2006
			US 2006062852 A1	23-03-2006
			US 2005100937 A1	12-05-2005
US 5938595	A	17-08-1999	AUCUN	