

(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  
19 mai 2016 (19.05.2016)

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2016/075410 A1**

- (51) Classification internationale des brevets :  
*B01L 3/00* (2006.01) *B01L 9/00* (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2015/053051
- (22) Date de dépôt international :  
10 novembre 2015 (10.11.2015)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :  
FR1460912 12 novembre 2014 (12.11.2014) FR
- (72) Inventeur; et  
(71) Déposant : **TRAN, Phuong Lan** [FR/FR]; 25 rue du  
Moulin de la Vierge, 75014 Paris (FR).
- (74) Mandataire : **BE LEADER INNOVATION**; 15 rue Tait-  
bout, 75009 Paris (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, BN, BR, BW, BY,

BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,  
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,  
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,  
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

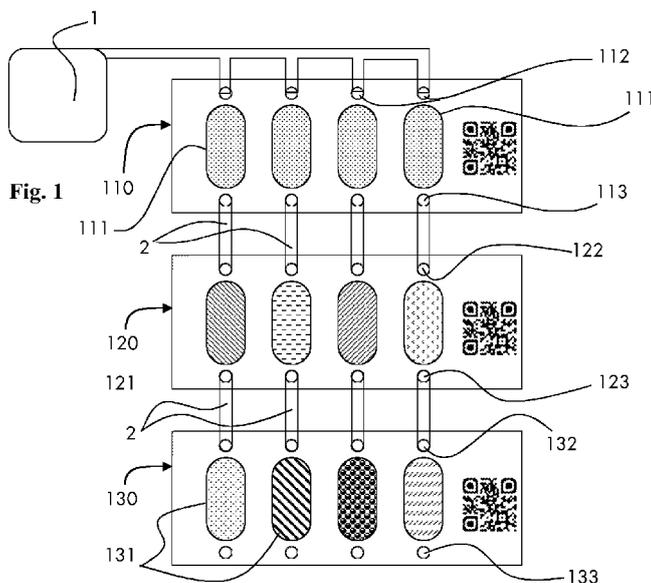
(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,  
TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,  
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB,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

Publiée :

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

(54) Title : METHOD AND DEVICE FOR SELECTIVE, SPECIFIC AND SIMULTANEOUS SORTING OF RARE TARGET CELLS IN A BIOLOGICAL SAMPLE

(54) Titre : PROCÉDÉ ET DISPOSITIF DE TRI SÉLECTIF, SPÉCIFIQUE ET SIMULTANÉ DE CELLULES RARES CIBLES DANS UN ÉCHANTILLON BIOLOGIQUE



(57) Abstract : The invention relates a multi-purpose, economical device and method for the selective, specific and simultaneous sorting of rare target cells in a biological sample. To achieve this, the device according to the invention comprises: • A first row (110) of at least two laminar-flow fluid chambers (111) each comprising an inlet (112), connected to a tank (1) containing a biological solution, and an outlet (113); • A last row (130) of laminar-flow fluid chambers (131) equal in number to the number of chambers (111) in the first row (110), wherein each fluid chamber (131) in the last row (130) comprises: - an inlet (132) connected to an outlet (113) of a chamber (111) in the first row (110); and - an outlet (133); • a solution-collection tank connected to each outlet (133) of the fluid chambers in the second row; • At least one pump suitable for circulating a sample of the biological solution in the fluid chambers in the first row, and then in the last row; wherein the laminar-flow fluid chambers each comprise a surface functionalized with molecules, at least some of which are capable of forming a bond with a receptor molecule carried by the target cells.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]

WO 2016/075410 A1

---

L'invention propose un dispositif et un procédé de tri sélectif, spécifique et simultané de cellules cibles rares dans un échantillon biologique, polyvalent et économique. À cette fin, le dispositif selon l'invention comprend : • Un premier rang (110) d'au moins deux chambres fluidiques (111) à flux laminaire comprenant chacune une entrée (112) connectée à un réservoir (1) d'une solution biologique, et une sortie (113); • Un dernier rang (130) de chambres fluidiques (131) à flux laminaire en nombre égal au nombre de chambres (111) du premier rang (110), chaque chambre fluidique (131) du dernier rang (130) comprenant : - une entrée (132) reliée à une sortie (113) d'une chambre (111) du premier rang (110); et - une sortie (133); • un réservoir de collecte de la solution, relié à chaque sortie (133) des chambres fluidiques du deuxième rang; • Au moins une pompe adaptée pour faire circuler un échantillon de la solution biologique dans les chambres fluidiques du premier rang puis du dernier rang; les chambres fluidiques à flux laminaire comprenant chacune une surface fonctionnalisée par des molécules dont au moins certaines sont aptes à former une liaison avec une molécule réceptrice portée par les cellules cibles.

## PROCÉDÉ ET DISPOSITIF DE TRI SÉLECTIF, SPÉCIFIQUE ET SIMULTANÉ DE CELLULES RARES CIBLES DANS UN ÉCHANTILLON BIOLOGIQUE.

5 L'invention concerne un procédé et un dispositif de tri sélectif, spécifique et simultané de cellules rares cibles dans un échantillon biologique.

Le domaine général concerné par l'invention est le domaine de la détection de cellules rares et leurs sous-populations hétérogènes dans un liquide  
10 biologique complexe (sang, moelle osseuse, ou autres, etc.). On entend par cellules « rares » des cellules cibles présentes dans un échantillon à une concentration comprise entre 1 et 10 cellules par millilitre (mL) d'échantillon comprenant  $10 \times 10^9$  cellules.

Plus spécifiquement, l'invention concerne le diagnostic/pronostic du  
15 cancer en Santé publique.

La mortalité associée aux tumeurs malignes est principalement due à la présence de métastases locorégionales distantes de la tumeur primitive. Le contrôle de la dissémination métastatique est un facteur important pour le pronostic de la maladie. Les applications qui en découlent comprennent le dépistage de  
20 populations à haut risque, le rendu d'informations prédictives de diagnostic, du pronostic, le traitement, la surveillance de la maladie ou de la réponse à un traitement, et l'optimisation d'un traitement ou développement d'une nouvelle thérapie en médecine moléculaire personnalisée.

Les cellules tumorales contenues dans le sang périphérique (CTC),  
25 ou dans les niches de moelle osseuse (DTC) de patients atteints d'un cancer, sont hétérogènes et composées de sous-populations de cellules d'origine épithéliale et de cellules non épithéliales : les cellules souches cancéreuses (CSC), les cellules mésenchymateuses, les cellules endothéliales non hématopoïétiques (CEC), etc.

La capacité à isoler, dénombrer et effectuer la caractérisation  
30 moléculaire des cellules tumorales disséminées dont les cellules tumorales d'origine

épithéliale (CTC et DTC), les cellules tumorales d'origine non-épithéliales (cellules souches cancéreuses (CSC), cellules endothéliales non hématopoïétique (CEC), et les cellules mésenchymateuses, etc., contribuerait à l'amélioration de la prise en charge clinique des patients atteints de cancer pour le diagnostic précoce, l'évaluation du processus tumoral, et la réponse thérapeutique, y compris la résistance au traitement.

D'autres applications en médecine prédictive ciblent les mêmes besoins où, dans les mêmes conditions de fréquence cellulaire, l'invention s'adresse à la détection et la caractérisation des cellules souches diverses et des cellules fœtales dans le sang maternel pour le diagnostic anténatal et les anomalies génétiques, etc.

En veille médicale, l'invention peut s'appliquer à la surveillance de patients à risque d'infarctus du myocarde par la détection et le suivi de l'altération des cellules endothéliales circulantes non hématopoïétique (CEC), à la surveillance post-vaccinale, au suivi de maladies auto-immunes, etc.

Parmi les technologies proposées et publiées, on en distingue deux types :

I. Les méthodes de détection des cellules rares en une seule étape, avec ou sans l'apport d'un anticorps unique de détection ;

II. Les méthodes de détection des cellules rares en deux étapes associant des billes magnétiques (CellSearch).

Parmi les méthodes en une seule étape (I) il existe :

I-i) une technique d'immuno-sélection par des billes magnétiques greffées avec un anticorps unique de reconnaissance cellulaire, CellSearch, développée par Veridex, (Johnson & Johnson), et validée par la Foods and Drugs Administration (FDA) (Cristofanilli, M et al. 2004). Toutes les études sont faites à l'aide d'un anticorps unique dirigé contre la molécule d'adhérence des cellules épithéliales (anticorps anti-EpCAM) ;

I-ii) des systèmes microfluidiques comprenant :

- a) des microplots de Si greffés avec l'anticorps anti-EpCam par l'équipe de M Toner (CTC-chip, Nagrath S. et al. 2007 ; Herringbone chip, Stott SL et al. 2010),
- b) un dispositif associant les billes magnétiques et la microfluidique pour trier les cellules (CTC-iChip, Ozkumur E et al. 2013).
- 5
- i-iii) une technique de séparation cellulaire, d'après un critère de taille, effectuée à l'aide de filtres avec des pores de diamètre 8  $\mu\text{m}$  (Wong NS et al. 2006). Cette démarche ne présente aucune sélectivité, étant donné la variabilité des tailles des cellules. Toutes les cellules tumorales ont des
- 10
- tailles variables.
- i-iv) une plate-forme microfluidique avec une nano-structure d'oxyde de graphène fonctionnalisée avec l'anticorps anti-EpCAM (Yoon HJ et al. 2013).
- Parmi les méthodes en deux étapes (II) il existe :
- 15
- ii-i) MagSweeper, une dérivation de la méthode de CellSearch utilisant des billes magnétiques greffées avec l'anticorps anti-EpCam (Talasaz AH et al. 2009) ;
- ii-ii) un microsystème basé sur les propriétés rhéologiques des cellules (Tang SJ et al. 2009) ;
- 20
- ii-iii) un dispositif microfluidique associant des colonnes de billes magnétiques nommé Ephesia (Saliba AE et al, 2010) ;
- ii-iv) une combinaison de la leukaphérèse avec le système CellSearch (Fischer JC et al. 2013) ;
- ii-v) l'utilisation de la diélectrophorèse associée à CellSearch, appelée
- 25
- DEPArray (Peeters DJE et al. 2013).

La limitation technique majeure de ces méthodes réside dans une détection unique et la caractérisation moléculaire d'une seule sous-population de cellules tumorales d'origine épithéliale (CTC et DTC), exprimant la molécule

30

d'adhérence épithéliale EpCAM.

De ce fait, aucune ne peut apporter une solution aux besoins médicaux pour la détection et la caractérisation moléculaire de multiples sous-populations hétérogènes de cellules d'origine épithéliales (CTC et DTC) et de cellules non épithéliales (CSC, cellules mésenchymateuses, CEC, etc.).

5 En outre, aucune des techniques précédentes n'est compatible à la fois avec une caractérisation IF (immunofluorescence) suivie d'une caractérisation FISH (fluorescence in situ hybridization en anglais ; hybridation in situ en fluorescence).

De plus, toutes ces techniques nécessitent un volume de sang traité  
10 compris entre 5 et 10 mL, et aucune ne peut être utilisée avec un échantillon de sang congelé, de sorte qu'elles sont toutes très contraignantes en utilisation.

Enfin, seule la technique par filtration permet une détection d'agrégats.

Cependant ces techniques par filtration, de même que les billes  
15 magnétiques, sont peu sensibles à la détection de cellules tumorales circulantes d'un cancer localisé en raison de leur très faible concentration sanguine, quand elles sont inférieures à 30 CTC dans 7,5 mL de sang (méthode CellSearch, Veridex). Seules les cellules circulantes de cancers métastasés peuvent être détectées par les techniques de filtration car leur concentration sanguine est très importante. Ces  
20 techniques souffrent donc d'une trop faible capacité de détection (environs une cellule pour 5 milliards de cellules), alors que le procédé selon l'invention permet une détection d'une cellule parmi 10 milliards de cellules. En vue des stratégies de médecine personnalisée, il est important que chaque sous-population de cellules rares soit caractérisée en fonction des critères de ciblage thérapeutique et de la  
25 réponse au traitement.

L'invention vise donc à proposer un dispositif et un procédé de tri de cellules cibles dans un échantillon biologique, sélectif, spécifique, simultané, polyvalent, économique, industrialisable c'est-à-dire permettant une détection et un comptage automatique, compatible à la fois avec une caractérisation IF et une  
30 caractérisation FISH, nécessitant un volume de sang inférieur à 5 mL, capable

d'utiliser un échantillon de sang congelé, permettant une détection d'agrégats, et apte à être utilisé dans des instruments d'analyse existants.

Un objectif de la présente invention est donc également de pouvoir détecter des populations et des sous-populations cellulaires de cancers localisés circulant dans le sang grâce au ciblage de leur détection par des anticorps spécifiques.

À cette fin, l'invention a pour objet un dispositif mésofluidique de tri sélectif, spécifique et simultané de cellules cibles rares dans un échantillon biologique à une concentration comprise entre 1 et 10 cellules par millilitre (mL) d'échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend :

- Un premier rang d'au moins deux chambres fluidiques à flux laminaire comprenant chacune une entrée connectée de manière fluidique à un réservoir d'une solution biologique, et une sortie ;
  - Un dernier rang de chambres fluidiques à flux laminaire en nombre égal au nombre de chambres du premier rang, chaque chambre fluidique du dernier rang comprenant :
    - une entrée reliée de manière fluidique à une sortie d'une chambre du premier rang ; et
    - une sortie ;
  - Au moins un réservoir de collecte de la solution, relié de manière fluidique à chaque sortie des chambres fluidiques du deuxième rang ;
  - Au moins une pompe adaptée pour faire circuler un échantillon de la solution biologique dans les chambres fluidiques du premier rang puis du dernier rang ;
- les chambres fluidiques à flux laminaire comprenant chacune une surface fonctionnalisée par des molécules dont au moins certaines sont aptes à former une liaison avec une molécule réceptrice portée par les cellules cibles.

Selon d'autres modes de réalisation :

- les surface fonctionnalisées des chambres du premier rang peuvent être munies de molécules capables de se fixer sélectivement avec une ou plusieurs population(s) cellulaire(s) de l'échantillon différentes des cellules cibles, et les surfaces fonctionnalisées des chambres du dernier rang et, éventuellement du ou des rangs intermédiaires, peuvent être munies de différents types de molécules capables de se fixer sélectivement avec une population(s) de cellules cibles ;
- les chambres fluidiques du premier rang peuvent être reliées au réservoir par un canal d'alimentation en liquide unique, constitué d'autant de segments de canal que de chambres fluidiques, les segments du canal d'alimentation étant de sections différentes et de plus en plus petites dans le sens de circulation du liquide, chaque segment étant en communication fluidique avec un orifice d'entrée d'une chambre fluidique pour faire entrer le liquide dans chaque chambre ;
- chaque rang peut être constitué par un capteur de particules d'intérêt comprenant :
  - un capot comportant des renforcements pour constituer les chambres, chaque renforcement étant en communication fluidique avec un orifice d'entrée de solution, et un orifice de sortie de solution ;
  - une lame montée de manière amovible et hermétique sous le capot pour constituer un fond des chambres fluidiques, et comprenant une surface, tournée vers le capot, recouverte d'une zone fonctionnalisée en regard de chaque renforcement ;
- le capteur de particules d'intérêt du premier rang peut comprendre un capot muni d'un canal d'alimentation en liquide, destiné à être relié au réservoir, et constitué d'autant de segments de canal que le capot comprend de renforcements, les segments du canal d'alimentation étant de sections différentes et de plus en plus petites dans le sens de circulation du liquide, chaque segment étant en communication fluidique avec un orifice d'entrée pour faire circuler le liquide dans les chambres ;

- le capot peut être transparent ;
- le capot peut être en copolymère cyclo-oléfine ;
- les entrées des chambres fluidiques de chaque rang à part du deuxième rang peuvent être reliées aux sorties des chambres fluidiques du rang précédent par  
5 des tubes de longueur inférieure à 5 cm, de préférence inférieure à 3 cm, et un diamètre interne compris entre 0,5 et 1,4 millimètre ;
- le dispositif peut comprendre, par référence à la position d'utilisation :
  - un capot supérieur comportant un rebord plat et des renforcements pour constituer les chambres du premier rang, chaque renforcement étant en  
10 communication fluide avec un orifice d'entrée de solution ;
  - au moins deux lames fonctionnalisées, comprenant chacune une surface tournée vers le capot recouverte d'une zone fonctionnalisée en regard de chaque renforcement, et percées d'autant d'orifices de sortie qu'il y a de zones fonctionnalisées ;
  - au moins une entretoise destinée à être disposée hermétiquement entre deux  
15 lames fonctionnalisées, et comprenant autant de lumières que le capot supérieur comprend de renforcement, chaque lumière définissant une chambre ;
  - un capot inférieur comportant autant de sorties que le premier capot  
20 comprend d'entrées ;
- les lames fonctionnalisées peuvent être transparentes aux longueurs d'onde compatibles avec des instruments d'analyse des lames ; et/ou
- chaque lame peut comporter un code visuel interprétable par un ordinateur, le code comportant une information relative aux molécules des zones  
25 fonctionnalisées de la lame.

L'invention a également pour objet un procédé de tri sélectif, spécifique et simultané de cellules cibles rares dans un échantillon biologique à une concentration comprise entre 1 et 10 cellules par millilitre (mL) d'échantillon,  
30 comprenant les étapes suivantes :

- a) fonctionnaliser des lames avec des molécules capables de se fixer sélectivement avec une ou plusieurs population(s) cellulaire(s) sur différentes zones de la lame destinées à définir chacune un fond d'une chambre fluide ;
- 5 b) équiper un dispositif précédent selon l'invention avec les lames ainsi fonctionnalisées ;
- c) relier l'entrée des chambres du premier rang à un réservoir de solution contenant les cellules cible à trier, et la sortie des chambres du dernier rang à un réservoir de récupération ;
- 10 d) apparier de manière fluide la sortie des chambres d'un rang avec l'entrée des chambres d'un autre rang jusqu'à ce que toutes les chambres soient reliées en série entre elles d'un rang à l'autre,
- e) faire circuler l'échantillon biologique dans les chambres, depuis le premier rang jusqu'au dernier rang de manière à fixer des cellules cibles sur les
- 15 molécules capables de se fixer sélectivement à ces cellules ;
- f) analyser les surfaces fonctionnalisées des lames contenant les cellules cibles fixées à l'étape e).

Selon un autre mode de réalisation, l'étape a) peut consister à :

- 20 a1) fonctionnaliser les zones de la lame du premier rang avec des molécules capables de se fixer sélectivement avec une ou plusieurs population(s) cellulaire(s) la ou les plus nombreuse(s) dans l'échantillon considéré et différentes des cellules cibles ;
- a2) fonctionnaliser les zone de la lame du ou des rang(s) suivant(s) avec
- 25 différents types de molécules capables de se fixer sélectivement avec une population(s) de cellules cibles, chaque zone fonctionnalisée comportant un seul type desdites molécules.

30 Le dispositif et le procédé selon l'invention ont l'avantage de permettre un tri sélectif, spécifique et simultané, grâce à la combinaison d'une

sélection positive avec une sélection négative des cellules et leurs sous-populations hétérogènes, par exemple, dans le sang périphérique et dans la moelle osseuse.

La versatilité du procédé et du dispositif selon l'invention permet le greffage d'un large spectre d'anticorps divers permettant en une seule étape une  
5 sélection positive et une sélection négative de cellules ciblées, sur chaque rang, constituant un immunocapteur mésofluidique muni de N chambres à flux laminaire indépendantes (N étant un entier avantageusement compris entre 4 et 6 inclus), mises en parallèle, par exemple sur une lame de microscopie fonctionnalisée par des silanes.

10 Le procédé et le dispositif selon l'invention permettent de répondre à une problématique médicale de détection de sous-populations de cellules rares en oncologie, en médecine prédictive, en médecine régénérative, etc.

Ils permettent de détecter sélectivement dans chaque chambre à flux laminaire une à dix cellules rares caractéristiques d'une sous-population, dans un  
15 millilitre (mL) de sang contenant  $10 \times 10^9$  cellules sanguines.

Les applications sont multiples : oncologie des tumeurs solides, hémopathies malignes etc.

Un intérêt majeur de la présente invention est qu'elle permet de répondre aux besoins médicaux dans le cas du cancer du sein triple négatif dont  
20 les cellules tumorales circulantes sont dépourvues de l'expression de l'antigène de surface EpCAM.

D'autres caractéristiques de l'invention seront énoncées dans la description détaillée ci-après, faite en référence aux dessins annexés, qui représentent, respectivement :

- 25 - la figure 1, une vue schématique en plan d'un premier mode de réalisation d'un dispositif de tri de cellules cibles selon l'invention à trois étages ;
- la figure 2, une vue schématique en plan d'une lame standard de microscopie à six zones fonctionnalisées ;
- la figure 3, une vue schématique en perspective d'un exemple de réalisation  
30 d'un capteur de particules d'intérêt de premier rang ;

- la figure 4, une vue schématique en perspective d'un exemple de réalisation d'un capteur de particules d'intérêt de dernier rang ou de rang intermédiaire ;
- la figure 5, une vue schématique en coupe d'un deuxième mode de réalisation d'un dispositif de tri de cellules cibles selon l'invention à deux étages ;
- 5 - la figure 6, une vue schématique en coupe du mode de réalisation d'un dispositif de tri de cellules cibles de la figure 5, avec un étage supplémentaire ;
- la figure 7, une vue schématique en coupe d'un troisième mode de réalisation d'un dispositif de tri de cellules cibles selon l'invention à trois étages ;
- la figure 8, une photographie d'une visualisation des marqueurs cellulaires par immunofluorescence d'une sélection négative de leucocytes ;
- 10 - les figures 9 et 10, des photographies d'une visualisation des marqueurs cellulaires par immunofluorescence d'une sélection positive de cellules CTC ;
- les figures 11 et 12, des photographies d'une visualisation des marqueurs cellulaires par immunofluorescence d'une sélection positive de cellules CEC ;
- 15 - les figures 13 à 15, une photographie d'une visualisation des altérations génomiques dans des sous-populations de cellules CTC
- la figure 16, une photographie d'un exemple de marquage de cellules vivantes du cancer du sein MCF7 par une sonde témoin d'endocytose en vue des marquages d'ARNm et de miARN ;
- 20 - la figure 17, une photographie après 5 jours de culture cellulaire avec le capteur de particules d'intérêt sans réservoir selon l'invention ;
- la figure 18, une vue schématique en perspective partielle du mode de réalisation d'un dispositif de tri de cellules cibles de la figure 7 ; et
- la figure 19, une vue schématique en coupe du mode de réalisation d'un
- 25 dispositif de tri de cellules cibles de la figure 3.

La figure 1 illustre un dispositif 100 de tri selon l'invention, comprenant un premier rang 110 de chambres fluidiques 111 munies chacune d'une entrée 112 connectée de manière fluidique à un unique réservoir 1 d'une solution biologique, et une sortie 113. Dans cet exemple de réalisation, ce premier

30 rang comporte quatre chambres fluidiques 111.

Avantageusement, les chambres fluidiques 111 du premier rang sont reliées au réservoir par un canal d'alimentation en liquide unique, constitué d'autant de segments de canal que de chambres fluidiques 111, les segments du canal d'alimentation étant de sections différentes et de plus en plus petites dans le sens de circulation du liquide, chaque segment étant en communication fluidique avec un orifice d'entrée d'une chambre fluidique 111 pour faire entrer le liquide dans chaque chambre. Comme ce sera décrit en relation avec les figures 3 et 19, ce canal est avantageusement porté par un capot rigide.

Le dispositif 100 comprend également, un deuxième rang 120 de chambres fluidiques 121 en nombre égal au nombre de chambres 111 du premier rang 110. Chaque chambre fluidique du deuxième rang comprend une entrée reliée de manière fluidique à une sortie d'une chambre du premier rang, et une sortie. En d'autres termes, si les chambres d'un même rang sont montées en parallèle, c'est-à-dire qu'elles ne communiquent pas entre elles, les chambres de deux rangs successifs sont montées en série, c'est-à-dire qu'elles communiquent de manière fluidique dans le sens de circulation de l'échantillon.

Le dispositif 100 comprend également un dernier rang 130 de chambres fluidiques 131 en nombre égal au nombre de chambres 111 du premier rang 110. Chaque chambre fluidique du dernier rang comprend une entrée 132 reliée de manière fluidique à une sortie d'une chambre du premier rang. Dans ce mode de réalisation, cette liaison fluidique est indirecte et se fait par l'intermédiaire des chambres 121 du deuxième rang.

Dans un mode de réalisation alternatif dans lequel il n'y aurait pas de rang intermédiaire (ici le deuxième rang), la liaison fluidique entre le dernier rang et le premier rang serait directe.

Les chambres fluidiques 131 du dernier rang comprennent également une sortie 133. Les sorties 133 du dernier rang sont reliées de manière fluidique à un réservoir de collecte non illustré sur la figure.

Les entrées des chambres fluidiques de chaque rang à partir du deuxième rang sont reliées aux sorties des chambres fluidiques du rang précédent

par des tubes 2 de longueur inférieure à 5 cm, de préférence inférieure à 3 cm, et un diamètre interne compris entre 0,5 et 1,4 millimètres.

Ces dimensions diminuent le volume mort d'échantillon (partie de l'échantillon restant dans les tuyaux) ce qui permet de limiter les risques que des  
5 cellules rares restent dans les tuyaux et ne soient pas captées par les chambres fluidiques.

L'échantillon de liquide circule dans le dispositif depuis le réservoir de solution biologique 1 vers le réservoir de collecte en passant par les trois rangs de chambres fluidiques. Cette circulation est permise par une pompe (non illustrée).  
10 Cette pompe peut être configurée pour pousser et/ou pour aspirer le liquide à travers les rangs de chambres fluidiques.

Autrement dit, un débit est imposé dans chaque chambre par une pompe mise en œuvre en amont et/ou en aval des chambres fluidiques. Selon un mode de réalisation préféré, la pompe est une pompe péristaltique à multiples  
15 canaux.

Les chambres fluidiques 111, 121, 131 comprennent chacune une surface fonctionnalisée par des molécules dont au moins certaines sont aptes à former une liaison avec une molécule réceptrice portée par les cellules cibles. Il peut  
20 avantageusement s'agir d'anticorps greffés sur des molécules de liaison avec la surface telles que des silanes.

Selon l'invention, les chambres présentent des dimensions à l'échelle mésofluidique et assurent un flux laminaire (c'est-à-dire sans turbulence).

L'échelle mésofluidique concerne des dispositifs dont les dimensions et configurations varient de quelques millimètres à un ou plusieurs centimètres. Ces  
25 dispositifs se distinguent des dispositifs microfluidiques dont au moins l'une des dimensions caractéristiques est de l'ordre du micromètre.

Le choix de cette échelle mésofluidique, grâce aux chambres à flux laminaire, permet de réduire les phénomènes rhéologiques encore mal maîtrisés en microfluidique. Un flux laminaire induit moins de contraintes sur les cellules qui  
30 peuvent être fragiles, et permet un recouvrement homogène de la surface

fonctionnalisée par l'échantillon, une immobilisation douce des cellules, et une augmentation du rendement de capture de cellules.

Selon un mode de réalisation préféré illustré en figure 2, la surface fonctionnalisée 210 des chambres fluidiques est portée par une lame de verre 200, telle qu'une lame de microscopie standard de dimensions L×l égale à 76×25mm (3"×1").

Avec une lame 200 de cette dimension, on réalise, de préférence, quatre à six zones fonctionnalisées 210 (correspondant à quatre à six chambres fluidiques) présentant une forme oblongue circonscrite par un rectangle de longueur 16 mm et de largeur 6 mm.

De préférence, l'agencement des chambres est tel qu'un espace libre est ménagé à l'une des extrémités de la lame de verre pour y apposer un code visuel 220 interprétable par un ordinateur, tel qu'un code-barres ou flashcode.

D'une manière générale, les lames fonctionnalisées sont avantageusement transparentes aux longueurs d'onde compatibles avec des instruments d'analyse des lames. Si l'instrument d'analyse est un microscope optique, alors les lames sont avantageusement en verre ou en polymère transparent aux longueurs d'ondes visible par un être humain.

Selon un mode de réalisation préféré illustré par exemple aux figures 3 et 4, chaque rang 110, 120, 130 est constitué par un capteur de particules d'intérêt 1100, 1200 comprenant un capot 1101, 1201, comportant des renforcements 1102, 1202 pour constituer les chambres, chaque renforcement étant en communication fluide avec un orifice d'entrée de solution 1103, 1203, et un orifice de sortie 1104, 1204 de solution.

Les renforcements présentent une épaisseur e (voir figure 4) déterminant la hauteur de chaque chambre. De préférence, cette épaisseur e est choisie égale à environ 0,5 mm. Avec une lame de microscopie 2 de taille standard et présentant quatre chambres de 16 mm de long et de 6 mm de large, on obtient

un capteur de particules d'intérêt présentant des chambres à flux laminaire de 48 mm<sup>3</sup> chacune.

Le faible volume de chacune de ces chambres permet, néanmoins, un flux laminaire et une réaction des particules d'intérêt avec peu de liquide.

5

Une lame est montée de manière amovible et hermétique sous le capot 1101, 1201 pour constituer un fond des chambres fluidiques, la lame comprenant une surface tournée vers le capot et recouverte d'une zone fonctionnalisée en regard de chaque renforcement.

10

Le capteur de particules d'intérêt de la figure 3 est un capteur adapté à être placé au premier rang. Il intègre directement un réservoir de solution 1. Il comprend un capot 1101 muni d'un canal d'alimentation en liquide 1105 relié au réservoir 1, et constitué d'autant de segments de canal que le capot comprend de renforcements 1102. Les segments du canal d'alimentation sont de sections différentes et de plus en plus petites dans le sens de circulation du liquide, chaque segment étant en communication fluidique avec un orifice d'entrée 1103 pour faire circuler le liquide dans les chambres. Un tel arrangement permet une diffusion et une répartition homogène de l'échantillon de liquide dans chacune des chambres fluidiques du premier rang.

15

20

Une vue en coupe de l'exemple de réalisation de la figure 3 est illustré en figure 19.

25

Le capteur de particules 1100, comprend une lame 1106, de préférence en verre ou en silicium, dont une face est fonctionnalisée au moyen de molécules de reconnaissance, adaptées aux particules que l'on souhaite capturer dans le liquide. Avantagusement, selon l'invention, les particules capturées au rang 1 ne sont pas les particules d'intérêt, mais d'autres particules, le rang 1 au moins servant à capturer les particules inintéressantes afin de « filtrer » l'échantillon pour, en quelque sorte le purifier et permettre la capture des particules d'intérêt au dernier rang (voir à partir d'un rang précédent, selon le nombre de rangs).

Un joint 1107 est disposé sur la lame 1106. Il est muni de quatre ouvertures délimitant chacune le contour d'une chambre à flux laminaire 1102.

Le capot 1101 est disposé au-dessus du joint 1107 et comprend un canal d'alimentation 1105 pour alimenter chaque chambre 1102 en liquide, et des conduites 1104 de sortie du liquide (non illustrées sur la figure 19) hors de chacune des chambres.

Le canal d'alimentation 1105 est muni d'autant de segments de canal que le joint comprend d'ouvertures. Dans l'exemple illustré, le canal d'alimentation 1105 comprend quatre segments de canal 1105a, 1105b, 1105c, 1105d.

Le canal d'alimentation 1105 est muni de moyens d'accélération du liquide le long du canal. Dans l'exemple de réalisation illustré en figure 19, les moyens d'accélération sont constitués par

Les quatre segments 1105a, 1105b, 1105c, 1105d du canal d'alimentation présentant chacun des sections différentes, les sections étant de plus en plus petites dans le sens de circulation du liquide, selon la flèche F1. Ces sections différentes constituent un moyen d'accélération du liquide permettant de maintenir sensiblement constante la vitesse du liquide le long du canal d'alimentation 1105, ce qui assure une distribution et une circulation homogènes des particules d'intérêt dans chaque chambre.

Dans l'exemple de la figure 19, le canal d'alimentation comprend un moyen d'accélération du fluide de sorte que les vitesses moyennes du fluide, en amont et en aval d'une conduite d'admission du liquide dans une chambre donnée, restent sensiblement constantes. Ceci permet une répartition homogène des particules entre les chambres et au sein d'une même chambre et assure la reproductibilité des conditions expérimentales entre les différentes chambres d'un même dispositif mésofluidique.

De préférence, chaque conduite d'admission est disposée à l'aplomb de chaque rétrécissement de section.

Ainsi, pour un dispositif mésofluidique selon l'invention à  $n$  chambres devant présenter un débit  $q$  dans chaque conduite d'admission de liquide dans une chambre, de section initiale  $S$  en amont des chambres, les sections sont réduites de  $1/n$  de  $S$  à chaque segment de canal.

5 Par exemple, pour le dispositif mésofluidique à quatre chambres de la figure 19, le canal d'alimentation 1105 présente un premier segment 1105a de section  $S_1$ , un deuxième segment 1105b de section  $S_2=3/4$  de  $S_1$ , un troisième segment 1105c de section  $S_3=1/2$  de  $S_1$ , et un quatrième segment 1105d de section  $S_4=1/4$  de  $S_1$ .

10 Grâce à ce changement de section particulier, la vitesse du fluide dans chaque segment reste sensiblement constante.

Avantageusement, le capot est transparent, et constitué, de préférence, en copolymère cyclo-oléfine tel que le TOPAS® COC commercialisé par la société TOPAS Advanced Polymers.

15 Le capteur de particules d'intérêt de la figure 4 est un capteur adapté à être placé à partir du deuxième rang jusqu'au dernier rang.

La figure 5 illustre un deuxième mode de réalisation d'un dispositif de tri selon l'invention, permettant un empilement des rangs de chambres fluidiques et une diminution de la longueur des connexions fluidiques entre les différents rangs.

20 Le dispositif 300 comprend, par référence à la position d'utilisation :

- un capot supérieur 310 comportant un rebord plat 311 et des renforcements 312 pour constituer les chambres du premier rang, chaque renforcement 312 étant en communication fluidique avec un orifice d'entrée de solution 313 ;
- 25 • deux lames fonctionnalisées 320-330, comprenant chacune une surface 321-331 tournée vers le capot recouverte d'une zone fonctionnalisée en regard de chaque renforcement, et percées d'autant d'orifices de sortie 322-332 qu'il y a de zones fonctionnalisées. Ces orifices permettent la liaison fluidique entre les différents rangs de chambre et jouent le rôle des tubes 2 du mode de réalisation
- 30 de la figure 1 ;

- une entretoise 340 destinée à être disposée hermétiquement entre les deux lames fonctionnalisées 320-330, et comprenant autant de lumières que le capot supérieur comprend de renforcement, chaque lumière définissant une chambre ; et
- 5 • un capot inférieur 350 comportant autant de sorties 351 que le premier capot 310 comprend d'entrées 313.

Les renforcements 312 et l'entretoise 340 présentent une épaisseur e déterminant la hauteur de chaque chambre. De préférence, cette épaisseur e est choisie égale à environ 0,5 mm.

10 Un tel dispositif est peu encombrant et facile à mettre en œuvre.

En outre, il est polyvalent car on peut facilement rajouter un étage de chambres fluidiques, comme cela est illustré en figure 6. Dans cette figure, le dispositif 300 comprend une entretoise 340 supplémentaire, et une lame fonctionnalisée 360 supplémentaire.

15 Dans les modes de réalisations des figures 5 et 6, les capots supérieurs 310 et inférieur 350, ainsi que les entretoises 340 comportent des épaulements, respectivement 314, 351, 341 et 342 permettant de caler latéralement les lames 320, 330 et 360.

20 Un moyen de maintien peut être prévu pour maintenir l'ensemble en position de sorte que les espaces entre les lames, les entretoises et les capots soient étanches.

Un mode de réalisation plus simple est illustré en figures 7 et 18, dans lequel les entretoises sont des joints 400 agencés entre les zones fonctionnalisées des lames pour définir les chambres fluidiques.

25 Bien entendu, le joint s'entend au sens large. Il peut être constitué de plusieurs boucles indépendantes, c'est-à-dire non reliées entre elles, mais délimitant chacune le contour d'une chambre à flux laminaire. Cependant, il est plus pratique que le joint soit constitué d'une seule pièce comprenant plusieurs ouvertures, c'est-à-dire formant plusieurs boucles reliées entre elles. Ce deuxième

mode de réalisation est illustré en figure 18. Sur cette figure 18, les capots 310 et 350 ne sont pas illustrés.

Pour la mise en œuvre de ces modes de réalisation, les lames fonctionnalisées peuvent avantageusement être en polymère pour permettre le perçage des orifices 322-332. Par exemple, le polymère peut être un polymère en "silicone fonctionnalisée" (type PDMS = polydimethylsiloxane fonctionnalisé), du PMMA, etc., en gardant le GPTS comme agent de couplage pour des protéines (anticorps, etc.).

Un dispositif selon l'invention permet de mettre en œuvre un procédé de tri sélectif, spécifique et simultané de cellules cibles dans un échantillon biologique, comprenant les étapes suivantes :

- a) fonctionnaliser des lames avec des anticorps sur différentes zones de la lame destinées à définir chacune un fond d'une chambre fluide ;
- b) équiper un dispositif selon l'invention avec les lames ainsi fonctionnalisées ;
- c) relier l'entrée des chambres du premier rang à un réservoir de solution contenant les cellules cible à trier, et la sortie des chambres du dernier rang à un réservoir de récupération ;
- d) apparier de manière fluide la sortie des chambres d'un rang avec l'entrée des chambres d'un autre rang jusqu'à ce que toutes les chambres soient reliées en série entre elles d'un rang à l'autre ;
- e) faire circuler l'échantillon biologique dans les chambres, depuis le premier rang jusqu'au dernier rang ;
- f) analyser les surface fonctionnalisées des lames contenant les cellules cibles rares.

Avantageusement, l'étape a) consiste à :

- a1) fonctionnaliser les zones de la lame du premier rang avec des molécules capables de se fixer sélectivement avec une ou plusieurs population(s) cellulaire(s) la ou les plus nombreuse(s) dans l'échantillon considéré et différentes des cellules cibles ;

a2) fonctionnaliser les zone de la lame du ou des rang(s) suivant(s) avec différents types de molécules capables de se fixer sélectivement avec une population(s) de cellules cibles, chaque zone fonctionnalisée comportant un seul type desdites molécules.

5

On obtient ainsi un dispositif dans lequel :

- les surface fonctionnalisées des chambres du premier rang sont munies de molécules capables de se fixer sélectivement avec une ou plusieurs population(s) cellulaire(s) de l'échantillon différentes des cellules cibles ;
- 10 • les surfaces fonctionnalisées des chambres du dernier rang et, éventuellement du ou des rangs intermédiaires, sont munies de différents types de molécules capables de se fixer sélectivement avec une population(s) de cellules cibles.

De cette manière, on réalise une sélection négative au premier rang, c'est-à-dire une sélection de cellules différentes de celles que l'on souhaite trier *in fine*. Par exemple, s'il s'agit d'un échantillon sanguin, le premier rang peut être  
15 avantageusement fonctionnalisé avec des anticorps ayant une affinité avec les leucocytes pour débarrasser l'échantillon de ce type de cellules.

La sélection positive peut se faire par exemple au deuxième rang, en fonctionnalisant les N chambres fluidiques avec des anticorps ayant une affinité  
20 pour différents types de cellules rares à piéger.

Plus généralement, une sélection négative selon l'invention permet de « nettoyer » l'échantillon avant d'opérer une sélection positive.

Si plusieurs types de cellules doivent être éliminés par une sélection négative, il est possible de prévoir une fonctionnalisation adaptée des p premiers  
25 rangs. Ensuite, les rangs suivants sont fonctionnalisés pour opérer une sélection positive des cellules rares à piéger.

Grâce au dispositif selon l'invention, une sélection négative et positive peut être faite en une seule opération, c'est-à-dire en un seul passage de l'échantillon dans le dispositif.

30 Plusieurs exemples d'applications sont décrits ci-après :

Une surface constituée d'une couche monomoléculaire auto-assemblée de silanes à chaînes courtes et à terminaison époxyde, 3-glycidoxypropyl-triméthoxysilane (GPTS), est utilisée pour fonctionnaliser les lames standard de microscopie. La surface fonctionnalisée par le GPTS est parfaitement hydrophile et conserve 1) ses propriétés de stabilité physique en cisaillement et en température, 2) ses propriétés de résistance chimique aux UV et à l'hydrolyse à pH 7,4, et 3) la préservation des propriétés biologiques des ligands protéiques greffés sur les chaînes GPTS. Les anticorps sont couplés directement sur la couche monomoléculaire auto-assemblée de silanes GPTS. Les propriétés natives des anticorps spécifiques sont intégralement conservées sur la monocouche de silanes GPTS.

#### EXEMPLE 1 : GREFFAGE DES ANTICORPS EN SÉLECTION NÉGATIVE ET POSITIVE

Les leucocytes sont éliminés, en sélection négative, par capture au rang 1 sur la lame de microscopie au moyen d'un anticorps anti-CD45 greffé sur la surface fonctionnalisée par le GPTS (distributeur Multiplex I avec un réservoir, Ch1 à Ch4 : Figure 3, Tableau I).

Tableau 1 : Niveau 1, distributeurs Multiplex I avec un réservoir				
Planchers + GPTS	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4
Rang 1 - anticorps	Anti-CD45	Anti-CD45	Anti-CD45	Anti-CD45

En sélection positive, sélective et spécifique, et simultanée, des sous-populations rares, chaque chambre à flux laminaire au rang 2 composant le capteur de particules d'intérêt est greffé au moyen d'anticorps spécifiques selon chaque sous-population comme suit (figure 4, Tableau 2) :

- Chambre 1) l'anticorps anti-EpCAM pour sélectionner, de façon sélective et spécifique, les cellules d'origine épithéliale (CTC),

- Chambre 2) l'anticorps anti-N cadhérine pour sélectionner, de façon sélective et spécifique, les cellules non épithéliales mésenchymateuses,
- Chambre 3) l'anticorps anti-CD133 pour sélectionner, de façon sélective et spécifique, les cellules souches cancéreuses (CSC), par exemple dans le cancer du côlon,
- Chambre 4) et l'anticorps anti-CD44 pour sélectionner, de façon sélective et spécifique, les cellules souches cancéreuses (CSC), par exemple dans le cancer du côlon.

Planchers + GPTS	Chambre 1	Chambre 2	Chambre 3	Chambre 4
Rang 1- capteurs de particules d'intérêt avec réservoir	Anti-CD45	Anti-CD45	Anti-CD45	Anti-CD45
Rang 2- capteurs de particules d'intérêt sans réservoir	Anti-EpCAM	Anti-N Cadhérine	Anti-CD133	Anti-CD44
Rang 3- capteurs de particules d'intérêt sans réservoir	Anti-EpCAM	Anti-N Cadhérine	Anti-CD133	Anti-CD44

La même sélection positive, sélective et spécifique et simultanée des mêmes sous-populations peut être répétée au rang 3, identique au rang 2, pour renforcer la statistique de capture cellulaire (Tableau 2).

Alternativement, au rang 3, le greffage des anticorps dans le capteur de particules d'intérêt peut être interverti comme suit (Tableau 3) :

- Ch1) l'anticorps, anti-N cadhérine pour sélectionner, de façon sélective et spécifique, les cellules non épithéliales mésenchymateuses,
- Ch2) l'anticorps, anti-EpCAM pour sélectionner, de façon sélective et spécifique, les cellules d'origine épithéliale (CTC),

- Ch3) l'anticorps, anti-CD44 pour sélectionner, de façon sélective et spécifique, les cellules souches cancéreuses (CSC), par exemple dans le cancer du côlon,
- Ch4) et l'anticorps anti-CD133 pour sélectionner, de façon sélective et spécifique, les cellules souches cancéreuses (CSC), par exemple dans le cancer du côlon.

Tableau 3 : Combinaison en 3 niveaux des capteurs de particules d'intérêt avec et sans réservoir				
Planchers + GPTS	Chambre 1	Chambre 2	Chambre 3	Chambre 4
Rang 1- capteurs de particules d'intérêt avec réservoir	Anti-CD45	Anti-CD45	Anti-CD45	Anti-CD45
Rang 2- capteurs de particules d'intérêt sans réservoir	Anti-EpCAM	Anti-Cadhérine	Anti-CD133	Anti-CD44
Rang 3- capteurs de particules d'intérêt sans réservoir	Anti-N Cadherine	Anti-EpCAM	Anti-CD44	Anti-CD133

5

### VARIANTE

Des sous-populations rares, non hématopoïétiques, dans le sang périphérique présentent également un intérêt dans leur détection. Les cellules endothéliales circulantes (CEC) sont des biomarqueurs de dommages vasculaires dans les pathologies inflammatoires, immunes, infectieuses, néoplasiques et cardiovasculaires.

Un exemple de procédé de détection des sous-populations de cellules rares comprenant les cellules d'origine épithéliale (CTC), les cellules non épithéliales mésenchymateuses, les cellules souches cancéreuses (CSC), et les cellules endothéliales circulantes (CEC). Les anticorps respectifs greffés sont : anti-EpCAM pour la sous-population des cellules tumorales d'origine épithéliale (CTC), anti N Cadherine pour la sous-population des cellules mésenchymateuses, anti-CD133 pour la sous-population des cellules souches cancéreuses (CSC), et anti-

15

CD146 pour la sous-population des cellules non hématopoïétiques (CEC) (Tableaux 4 et 5).

Tableau 4 : Combinaison en 3 niveaux des capteurs de particules d'intérêt avec et sans réservoir				
Planchers + GPTS	Chambre 1	Chambre 2	Chambre 3	Chambre 4
Rang 1- capteurs de particules d'intérêt avec réservoir	Anti-CD45	Anti-CD45	Anti-CD45	Anti-CD45
Rang 2- capteurs de particules d'intérêt sans réservoir	Anti-EpCAM	Anti-N Cadherine	Anti-CD133	Anti-CD146
Rang 3- capteurs de particules d'intérêt sans réservoir	Anti-EpCAM	Anti-N Cadherine	Anti-CD133	Anti-CD146

Ou

Tableau 5 : Combinaison en 3 niveaux des capteurs de particules d'intérêt avec et sans réservoir				
Planchers + GPTS	Chambre 1	Chambre 2	Chambre 3	Chambre 4
Rang 1- capteurs de particules d'intérêt avec réservoir	Anti-CD45	Anti-CD45	Anti-CD45	Anti-CD45
Rang 2- capteurs de particules d'intérêt sans réservoir	Anti-EpCAM	Anti-N Cadherine	Anti-CD133	Anti-CD146
Rang 3- capteurs de particules d'intérêt sans réservoir	Anti-N Cadherine	Anti-EpCAM	Anti-CD146	Anti-CD133

5

Ce montage en série des capteurs de particules d'intérêt avec un réservoir (rang 1 ; voir figure 3), et des capteurs de particules d'intérêt sans réservoir (voir figure 4) permet, de façon bien définie par l'utilisateur, de cibler quatre sous-

populations d'intérêt de façon sélective et spécifique et simultanée. Le dispositif selon l'invention permet de pallier l'insuffisance des méthodes de détection connues utilisant un anticorps unique anti-EpCAM.

En effet, une détection classique avec un anticorps unique anti-EpCAM ne peut en aucun cas détecter en même temps les cellules non épithéliales mésoenchymateuses, ni les cellules souches cancéreuses ni les cellules non hématopoïétiques endothéliales.

## EXEMPLE 2: VISUALISATION DES MARQUEURS CELLULAIRES PAR IMMUNOFLUORESCENCE

Deux exemples de détection sélective et spécifique et simultanée :

1) une sous-population de CTC d'origine épithéliale, et 2) une sous-population de cellules non hématopoïétiques CEC (cellules endothéliales circulantes) par des marqueurs protéiques cellulaires dans les cancers métastatiques du côlon et de la prostate.

### 1. Sélection négative : filtration leucocytaire

L'anticorps anti-leucocytaire anti-CD45 cible la majorité des leucocytes dans le sang.

La Figure 8 visualise la forte population leucocytaire Le. Les leucocytes sont marqués par le marqueur nucléaire DAPI.

### 2. Sélection positive

#### A. CTC d'origine épithéliale

L'antigène EpCAM est une molécule d'adhérence cellulaire exprimée à la surface de la cellule tumorale d'origine épithéliale. Le greffage de l'anticorps anti-EpCAM sur une lame de microscopie standard fonctionnalisée par le GPTS (3-glycidoxypropyl-triméthoxysilane), dans un tampon phosphate (PBS), pH 7,4, contenant 0,5% Tréhalose (Sigma), permet de cibler l'identification des CTC d'origine épithéliale. Les CTC sont ensuite identifiées par un marqueur cellulaire exprimant la cytokératine, l'anticorps anti-pan cytokératine, dans un tampon

phosphate (PBS), contenant 0,1% d'albumine du sérum bovin (BSA). La caractérisation est réalisée par immunofluorescence pour confirmer l'origine épithéliale de la cellule détectée.

Les figures 9 et 10 montrent une CTC 500, capturée par l'anticorps anti-EpCAM (fluorescence verte), provenant soit d'un cancer métastatique du côlon (Figure 9), soit d'un cancer métastatique de la prostate (Figure 10). Le marqueur nucléaire est le DAPI (bleu).

### B. Cellules non hématopoïétiques : cellule endothéliale circulante (CEC)

MCAM est une glycoprotéine exprimée à la surface de la cellule endothéliale. Le greffage de l'anticorps anti-MCAM (anti-CD146) sur une lame de microscopie standard, fonctionnalisée par le GPTS (3-glycidoxypropyl-triméthoxysilane), dans un tampon phosphate (PBS), pH 7,4, contenant 0,5% Tréhalose (Sigma), permet de cibler leur identification et leur capture. Les CEC sont ensuite identifiées par l'anticorps anti-CD144 dirigé contre la VE-cadhérine (Vascular Endothelial) dans un tampon phosphate (PBS), contenant 0,1% d'albumine du sérum bovin (BSA). La caractérisation est réalisée par immunofluorescence pour confirmer la cellule endothéliale.

Les figures 11 et 12 montrent une CEC 510 provenant d'un cancer métastatique du côlon (Figure 11) et une CEC d'un cancer métastatique de la prostate (Figure 12). Les CEC sont caractérisées par immunofluorescence par l'anticorps anti-CD144 (fluorescence violette). Le marqueur nucléaire est le DAPI (bleu).

Une liste non exhaustive des marqueurs pouvant être utilisés pour cibler les sous-populations cellulaires d'origine épithéliales et non épithéliales pour leurs caractérisations et leurs identifications est donnée ci-après :

Type cellulaire	Marqueur(s) utilisé(s) pour l'isolement de sous-populations
-----------------	---

Épithélial	EpCAM, BerEP4, MUC 1,
Mésenchymateux	N Cadhérine, Cadhérine 11
Endothélial	MCAM (CD146), VE-cadhérine (CD144)
Leucocyte	CD45
Lymphocyte T	CD3
Lymphocyte B	CD20
Cellule souche hématopoïétique	CD34
Cellule souche mésenchymateuse	CD44, CD45, CD90, CD150, CD299
Cellule tumorale (cancer du sein, de la prostate)	HER2

Une liste des marqueurs pouvant être utilisés pour cibler les sous-populations de cellules souches cancéreuses (CSC) pour leurs caractérisations et leurs identifications est donnée ci-après :

5

Type de tumeur	Marqueur(s) utilisé(s) pour l'isolement de CSC
Hémopathies malignes	CD34+, CD38-
Côlon	CD133+, CD44+, Lin-
Sein	CD44+, CD24-/low
Mélanome	Transporteur ABCB5
Prostate	CD44+, CD133+, $\alpha 2\beta 1$
Pancréas	CD44+, CD24+, CD133+
Glioblastome	CD133+

Foie	CD133+, CD44+, CD90+
Poumon	CD133+
VADS	CD44+

Un autre avantage technique majeur et convivial du dispositif selon l'invention porte sur le développement unique de la caractérisation des cellules d'intérêt accompagnée par une suite d'analyses moléculaires successives.

Le flux de caractérisation moléculaire consiste en une procédure d'identification, en plusieurs étapes, sur la même lame de verre et la même cellule, 1) au moyen d'un marqueur protéique fluorescent (anticorps), 2) par l'analyse des altérations génomiques (amplifications géniques, délétions, et réarrangements) par hybridation in situ en fluorescence (FISH) au moyen de sondes spécifiques d'ADN, 3) la caractérisation in situ des ARNm par des sondes spécifiques d'ARN et des micro-ARN (miARN) par des nanosondes.

**EXEMPLE 3 : – VISUALISATION DES ALTÉRATIONS GÉNOMIQUES DANS LES SOUS-POPULATIONS DE CTC PAR HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE (FISH) : AMPLIFICATIONS GÉNIQUES, DÉLÉTIONS, RÉARRANGEMENTS, AU MOYEN DE SONDES SPÉCIFIQUES D'ADN.**

La valeur ajoutée de la lame de microscopie standard, fonctionnalisée pour la détection des sous-populations de CTC d'origine épithéliale et non épithéliale, est sa remarquable capacité de pouvoir subir de multiples traitements successifs comme :

- 1) le marquage des cellules d'intérêt par des marqueurs protéiques cellulaires fluorescents et son identification sous microscope,
- 2) un traitement spécifique est appliqué pour éliminer le bruit de fonds fluorescent, puis un reconditionnement des cellules d'intérêt détectées par le

marquage des noyaux par des sondes nucléiques par hybridation in situ en fluorescence (FISH) pour identifier leurs altérations génomiques.

La figure 13 montre le noyau 520 d'une CTC d'origine épithéliale d'un cancer métastatique du côlon montrant une amplification génique (ronds en tirets 521) révélée au moyen d'une sonde ciblant le gène EGFR (Kreatech, Holland).

La figure 14 montre le noyau d'une CTC 530 d'origine épithéliale d'un cancer métastatique de la prostate montrant une amplification génique (ronds en tirets 531) révélée au moyen d'une sonde ciblant le gène PTEN (Kreatech, Holland).

La figure 15 montre le noyau d'une CTC 540 d'origine épithéliale d'un cancer métastatique de la prostate montrant une amplification génique (ronds en trait plein 541, en tirets 542 et en grisé 543) révélée au moyen d'une sonde ciblant le gène de fusion TMPRSS2-ERG (Kreatech, Holland).

Le dispositif selon l'invention peut également être utilisé pour deux applications particulièrement intéressantes :

#### **EXEMPLE 4 : L'ANALYSE SUR CELLULES VIVANTES DES ARNm ET DES miARN.**

La capture de cellules vivantes et uniques par le dispositif selon l'invention et, en particulier, les capteurs de particules d'intérêt avec et sans réservoir, est un atout pour une analyse multiplex simultanée d'ARNm au moyen de nanoparticules fonctionnalisées par de multiples séquences de nucléotides et fonctionnant comme des sondes d'hybridation directes (Smart Flares, Merck-Millipore), chaque sonde étant couplée à un chromophore.

D'autre part, le deuxième atout est son application à destination de l'analyse des miARN dans une cellule vivante et unique (Smart Flares, Merck-Millipore). Les miARN sont des biomarqueurs de la progression tumorale.

Ce sont de nouveaux outils d'analyse pour compléter un diagnostic précoce, anticiper la progression de la maladie, identifier les patients à haut risque, prédire la récurrence après le traitement et surveiller la réponse du patient au traitement.

La figure 16 illustre un exemple de marquage des cellules vivantes 560 du cancer du sein MCF7 par une sonde témoin d'endocytose en vue des marquages d'ARNm et de miARN (Smart Flares, Merck-Millipore). Les cellules 560 du cancer du sein MCF7 sont capturées sur une lame de microscopie fonctionnalisée par le GPTS et greffée avec l'anticorps anti-EpCAM. Elles sont ensuite marquées par  
5 par le GPTS et greffée avec l'anticorps anti-EpCAM. Elles sont ensuite marquées par une sonde témoin de l'endocytose des nanoparticules et incubées à 37°C et sous 5% de CO2 pendant 12 heures.

#### EXEMPLE 5 : CULTURE CELLULAIRE AVEC LE CAPTEUR DE PARTICULES D'INTÉRÊT SANS RÉSERVOIR

10 Pour la mise en culture des cellules, le capteur de particules d'intérêt sans réservoir et sa lame fonctionnalisée GPTS sont stérilisés en éthanol absolu pendant 3 minutes. Après séchage, le plancher de chaque chambre est greffé avec l'anticorps anti-EpCAM pour la capture des cellules du cancer du sein MCF7. Le capteur de particules d'intérêt sans réservoir est ensuite mis dans une boîte de Pétri  
15 stérile et incubée dans un incubateur à 37°C et 5% CO2 pendant 5 jours. Après 5 jours, des amas 570 de cellules du cancer du sein MCF7 se sont développés (Figure 17).

En résumé, le grand avantage du procédé et du dispositif selon  
20 l'invention est sa capacité de tri sélectif et spécifique, et simultanément de toutes les sous-populations hétérogènes des cellules rares circulantes, quel que soit le stade de la maladie (cancer localisé ou métastatique). En outre, la convivialité du dispositif selon l'invention autorise 1) des greffages d'anticorps s'adressant à chaque sous-population de cellules d'intérêt, 2) des analyses moléculaires très performantes des  
25 cellules d'intérêt grâce au support de la lame de verre résistante aux multiples manipulations expérimentales, convivial et à faible coût par rapport à des supports en Si.

## REVENDEICATIONS

1. Dispositif (100) mésofluidique de tri sélectif, spécifique et simultané de cellules cibles rares dans un échantillon biologique à une concentration comprise entre 1 et 5 10 cellules par millilitre d'échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend :
- Un premier rang (110) d'au moins deux chambres fluidiques (111) à flux laminaire comprenant chacune une entrée (112) connectée de manière fluidique à un réservoir (1) d'une solution biologique, et une sortie (113) ;
  - Un dernier rang (130) de chambres fluidiques (131) à flux laminaire en nombre 10 égal au nombre de chambres (111) du premier rang (110), chaque chambre fluidique (131) du dernier rang (130) comprenant :
    - une entrée (132) reliée de manière fluidique à une sortie (113) d'une chambre (111) du premier rang (110) ; et
    - une sortie (133) ;
  - 15 • Au moins un réservoir de collecte de la solution, relié de manière fluidique à chaque sortie (133) des chambres fluidiques du deuxième rang ;
  - Au moins une pompe adaptée pour faire circuler un échantillon de la solution biologique dans les chambres fluidiques du premier rang puis du dernier rang ; les chambres fluidiques à flux laminaire comprenant chacune une surface 20 fonctionnalisée par des molécules dont au moins certaines sont aptes à former une liaison avec une molécule réceptrice portée par les cellules cibles.
2. Dispositif selon la revendication 1, comprenant au moins un rang intermédiaire (120) de chambres fluidiques (121) en nombre égal au nombre de chambres (111) du premier rang (110), chaque chambre fluidique (121) d'un rang intermédiaire 25 (120) comprenant une entrée (122) reliée de manière fluidique à une sortie (113) d'une chambre du premier rang (110), et une sortie (123).
3. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, dans lequel :
- les surface fonctionnalisées des chambres du premier rang sont munies de 30 molécules capables de se fixer sélectivement avec une ou plusieurs population(s) cellulaire(s) de l'échantillon différentes des cellules cibles ;

- les surfaces fonctionnalisées des chambres du dernier rang et, éventuellement du ou des rangs intermédiaires, sont munies de différents types de molécules capables de se fixer sélectivement avec une population(s) de cellules cibles.

4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel les  
5 chambres fluidiques (111) du premier rang sont reliées au réservoir par un canal  
d'alimentation en liquide unique, constitué d'autant de segments de canal que de  
chambres fluidiques (111), les segments du canal d'alimentation étant de sections  
différentes et de plus en plus petites dans le sens de circulation du liquide, chaque  
segment étant en communication fluidique avec un orifice d'entrée d'une chambre  
10 fluidique (111) pour faire entrer le liquide dans chaque chambre.

5. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel chaque  
rang est constitué par un capteur de particules d'intérêt (1100, 1200) comprenant :

- un capot (1101, 1201) comportant des renforcements (1102, 1202) pour  
constituer les chambres, chaque renforcement étant en communication fluidique  
15 avec un orifice d'entrée de solution (1103, 1203), et un orifice de sortie (1104,  
1204) de solution ;
- une lame montée de manière amovible et hermétique sous le capot pour constituer  
un fond des chambres fluidiques, et comprenant une surface, tournée vers le  
capot, recouverte d'une zone fonctionnalisée en regard de chaque renforcement.

20 6. Dispositif selon la revendication 5, dans lequel le capteur de particules d'intérêt  
(1100) du premier rang comprend un capot muni d'un canal d'alimentation en  
liquide, destiné à être relié au réservoir, et constitué d'autant de segments de canal  
que le capot comprend de renforcements, les segments du canal d'alimentation étant  
de sections différentes et de plus en plus petites dans le sens de circulation du liquide,  
25 chaque segment étant en communication fluidique avec un orifice d'entrée pour faire  
circuler le liquide dans les chambres.

7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, dans lequel le  
capot est transparent.

8. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, dans lequel le  
30 capot est en copolymère cyclo-oléfine.

9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel les entrées des chambres fluidiques de chaque rang à part du deuxième rang sont reliées aux sorties des chambres fluidiques du rang précédent par des tubes de longueur inférieure à 5 cm, de préférence inférieure à 3 cm, et un diamètre interne compris  
5 entre 0,5 et 1,4 millimètre.

10. Dispositif (300) selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comprenant, par référence à la position d'utilisation :

- un capot supérieur (310) comportant un rebord plat (311) et des renforcements (312) pour constituer les chambres du premier rang, chaque renforcement étant  
10 en communication fluidique avec un orifice d'entrée (313) de solution ;
- au moins deux lames fonctionnalisées (320-330), comprenant chacune une surface (321-331) tournée vers le capot recouverte d'une zone fonctionnalisée en regard de chaque renforcement, et percées d'autant d'orifices de sortie (322-332) qu'il y a de zones fonctionnalisées ;
- 15 • au moins une entretoise (340) destinée à être disposée hermétiquement entre deux lames fonctionnalisées (320-330), et comprenant autant de lumières que le capot supérieur comprend de renforcement, chaque lumière définissant une chambre ;
- un capot inférieur (350) comportant autant de sorties (351) que le premier capot  
20 (310) comprend d'entrées (313).

11. Dispositif selon la revendication 10, dans lequel les lames fonctionnalisées sont transparentes aux longueurs d'onde compatibles avec des instruments d'analyse des lames.

12. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 5 à 11, dans lequel  
25 chaque lame comporte un code visuel (220) interprétable par un ordinateur, le code comportant une information relative aux molécules des zones fonctionnalisée de la lame.

13. Procédé de tri sélectif, spécifique et simultané de cellules cibles rares dans un échantillon biologique à une concentration comprise entre 1 et 10 cellules par  
30 millilitre (mL) d'échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) fonctionnaliser des lames avec des molécules capables de se fixer sélectivement avec une ou plusieurs population(s) cellulaire(s) sur différentes zones de la lame destinées à définir chacune un fond d'une chambre fluide ;
- 5 b) équiper un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 avec les lames ainsi fonctionnalisées ;
- c) relier l'entrée des chambres du premier rang à un réservoir de solution contenant les cellules cible à trier, et la sortie des chambres du dernier rang à un réservoir de récupération ;
- 10 d) apparier de manière fluide la sortie des chambres d'un rang avec l'entrée des chambres d'un autre rang jusqu'à ce que toutes les chambres soient reliées en série entre elles d'un rang à l'autre,
- e) faire circuler l'échantillon biologique dans les chambres, depuis le premier rang jusqu'au dernier rang de manière à fixer des cellules cibles sur les
- 15 molécules capables de se fixer sélectivement à ces cellules ;
- f) analyser les surfaces fonctionnalisées des lames contenant les cellules cibles fixées à l'étape e).
14. Procédé selon la revendication 13, dans lequel l'étape a) consiste à :
- a1) fonctionnaliser les zones de la lame du premier rang avec des molécules
- 20 capables de se fixer sélectivement avec une ou plusieurs population(s) cellulaire(s) la ou les plus nombreuse(s) dans l'échantillon considéré et différentes des cellules cibles ;
- a2) fonctionnaliser les zone de la lame du ou des rang(s) suivant(s) avec différents types de molécules capables de se fixer sélectivement avec une
- 25 population(s) de cellules cibles, chaque zone fonctionnalisée comportant un seul type desdites molécules.

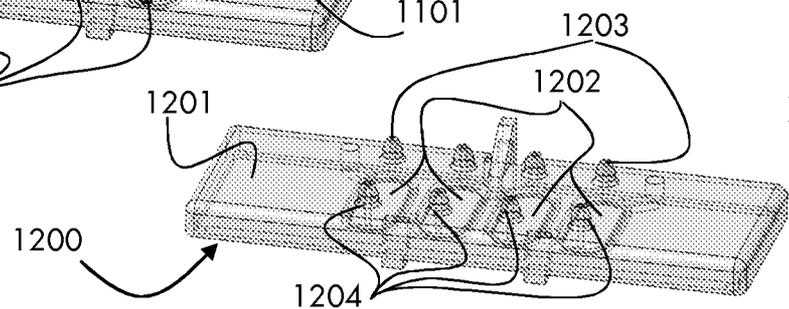
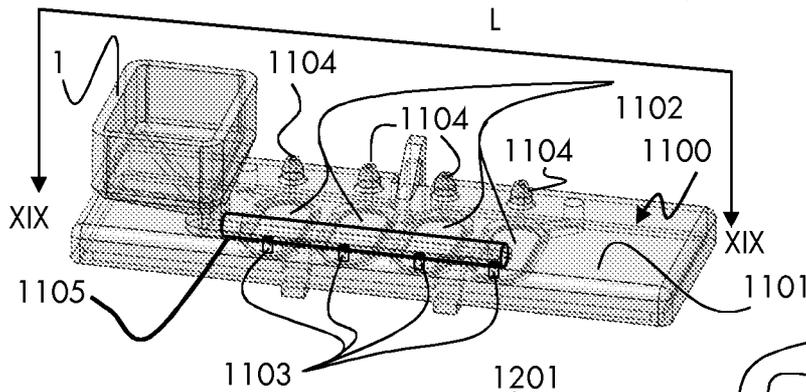
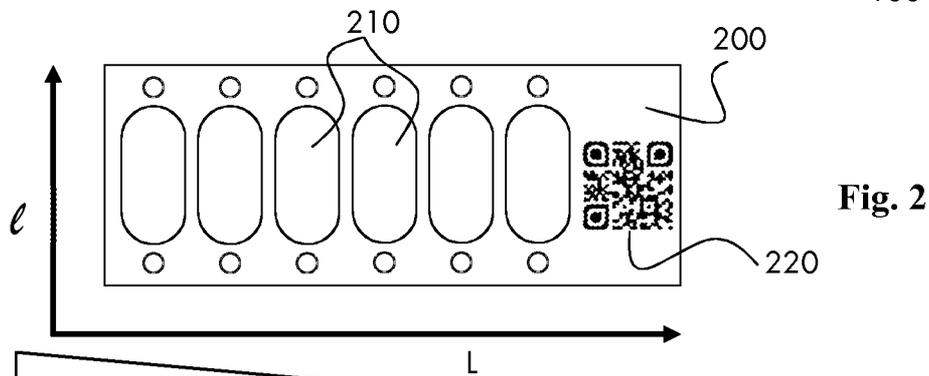
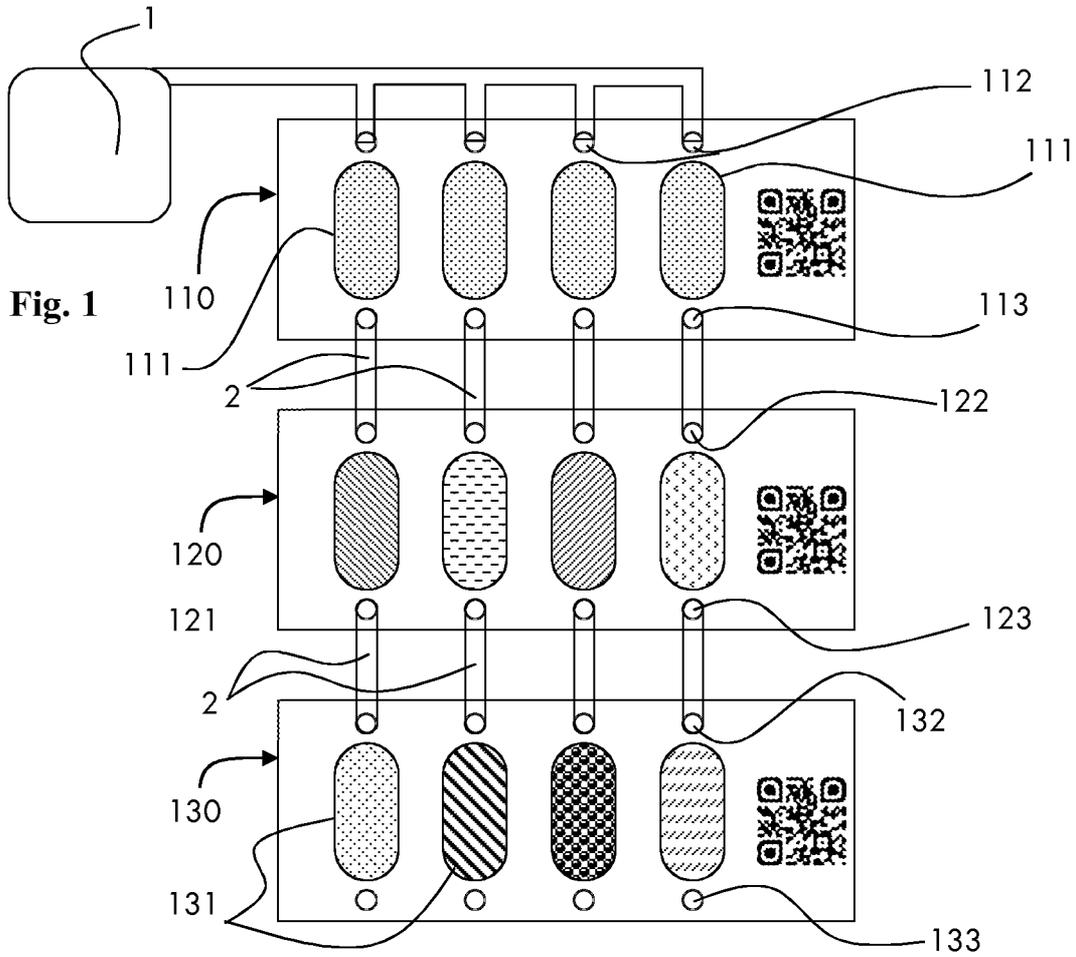


Fig. 4

2/4

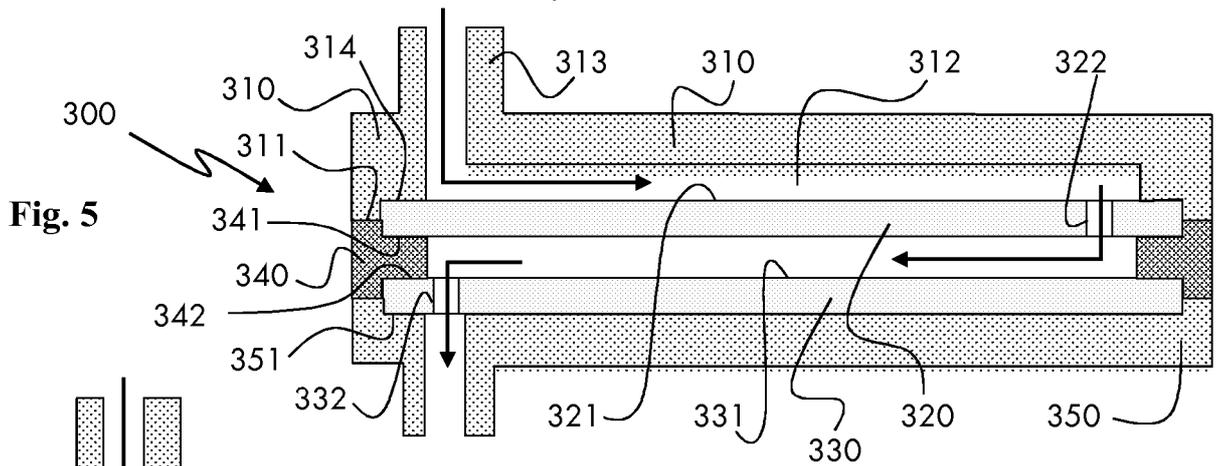


Fig. 5

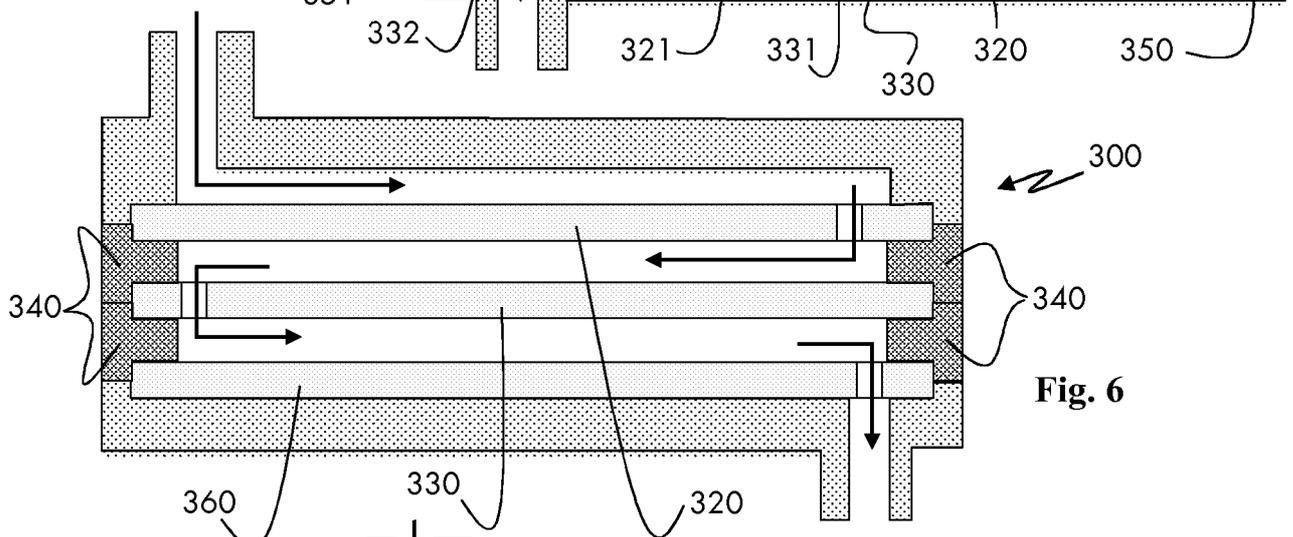


Fig. 6

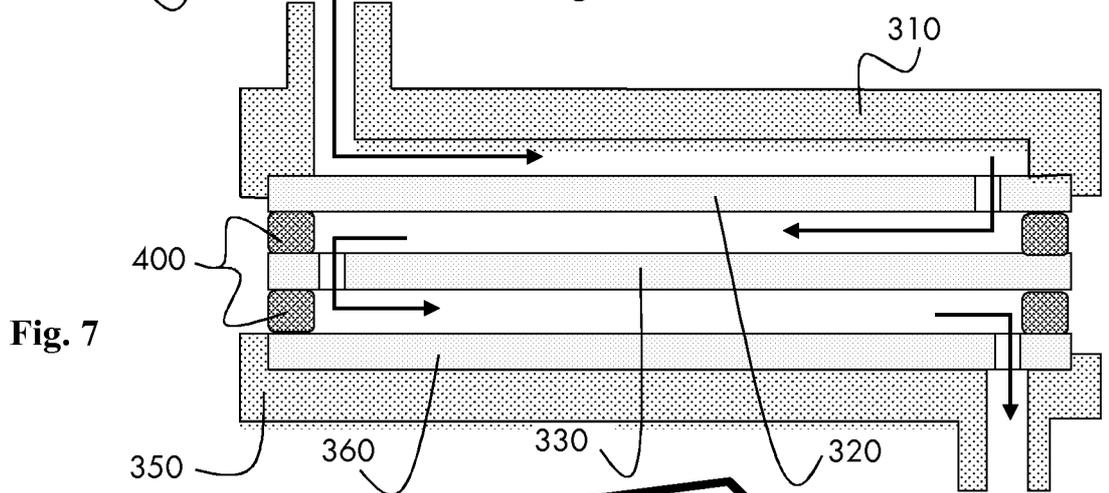


Fig. 7

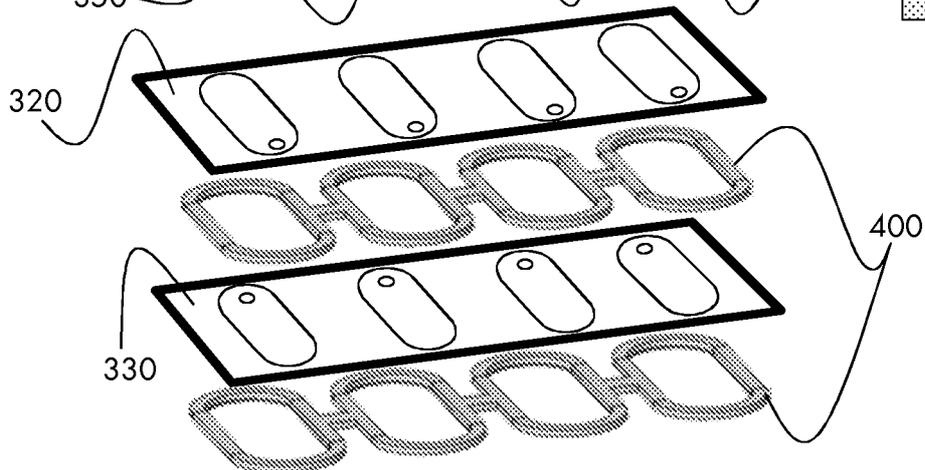


Fig. 18

3/4

Fig. 8

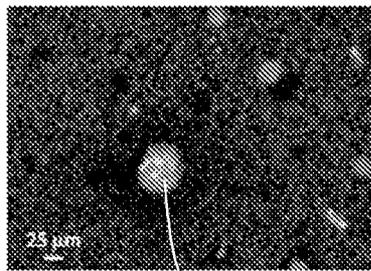
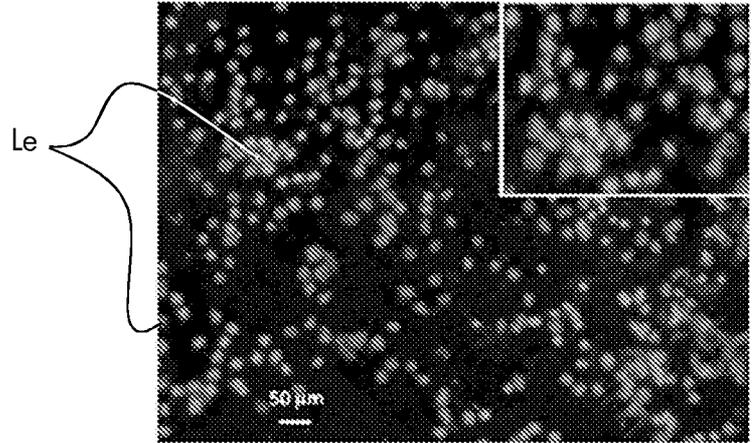


Fig. 9

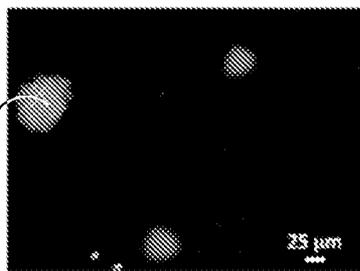


Fig. 10

500

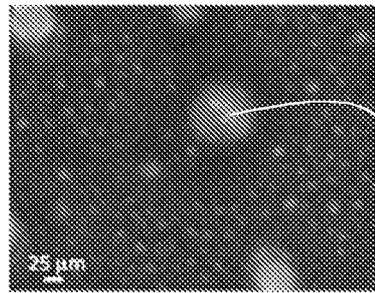


Fig. 11

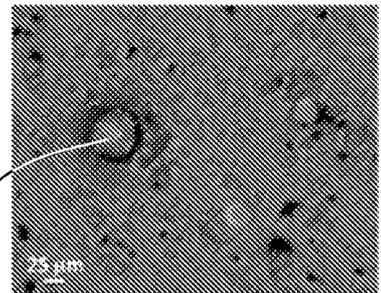
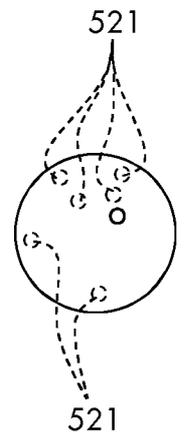
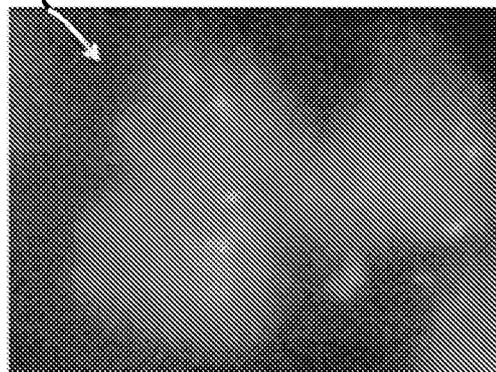


Fig. 12

510

Fig. 13



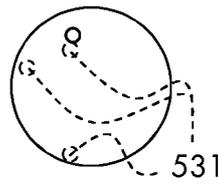
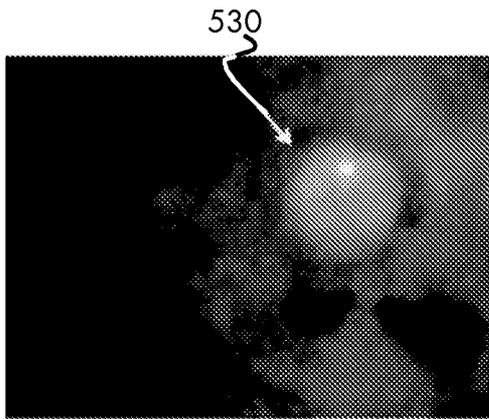


Fig. 14

Fig. 15

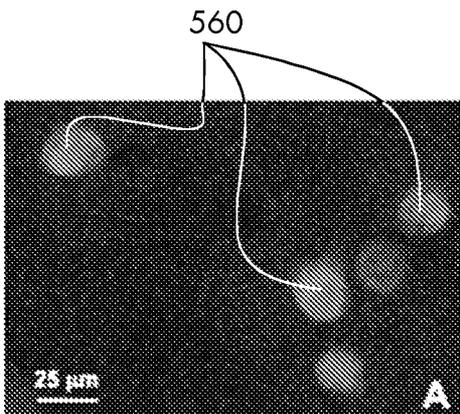
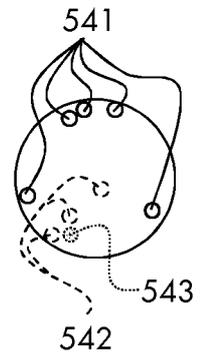
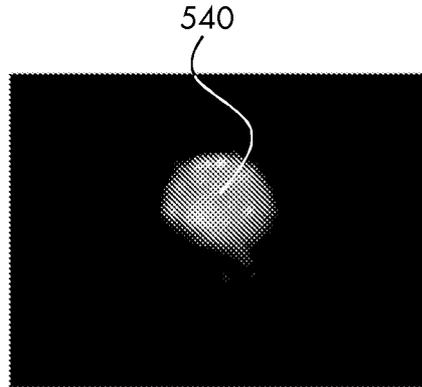


Fig. 17

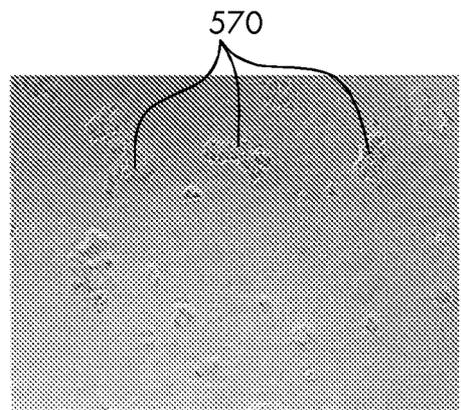


Fig. 16

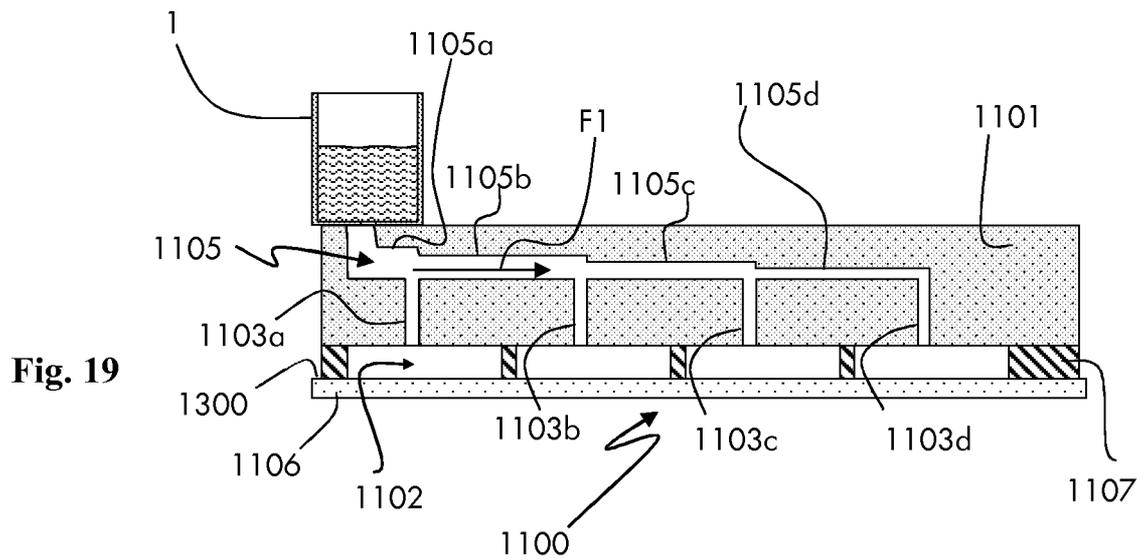


Fig. 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2015/053051

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. B01L3/00 B01L9/00  
ADD.  
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)  
B01L  
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 practicable, search terms used)  
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/41995 A1 (PYROSEQUENCING AB [SE]; SAMUELS ADRIAN JAMES [GB]; ANDERSSON HELEN [SE] 30 May 2002 (2002-05-30) page 3, line 27 - line 35 page 5, line 27 - line 30 page 6, line 35 - page 7, line 6 page 8, line 26 - line 36 figures 1a, 5	1,2
X	US 2006/215155 A1 (WEBER LUTZ [DE]) 28 September 2006 (2006-09-28) paragraphs [0021], [0041], [0042], [0047], [0051], [0053], [0054], [0076], [0077], [0101] figures 1-3, 7b	1-14
	----- -/--	

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 application or patent 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
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  28 January 2016	Date of mailing of the international search report  08/02/2016
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  Bischoff, Laura

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2015/053051

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 2004/001779 A1 (ANDERSON CLIFFORD L [US] ET AL) 1 January 2004 (2004-01-01) the whole document -----	1-12
A	EP 1 374 989 A2 (AGILENT TECHNOLOGIES INC [US]) 2 January 2004 (2004-01-02) the whole document -----	1-12
A	US 2005/009101 A1 (BLACKBURN GARY [US]) 13 January 2005 (2005-01-13) the whole document -----	1-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2015/053051

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0241995	A1	30-05-2002	AU 2390102 A WO 0241995 A1	03-06-2002 30-05-2002
-----				
US 2006215155	A1	28-09-2006	DE 10336849 A1 EP 1654065 A1 JP 4640549 B2 JP 2007501940 A US 2006215155 A1 WO 2005016529 A1	10-03-2005 10-05-2006 02-03-2011 01-02-2007 28-09-2006 24-02-2005
-----				
US 2004001779	A1	01-01-2004	AU 2003239267 A1 CA 2488644 A1 EP 1515802 A1 JP 2005531006 A US 2004001779 A1 US 2009018034 A1 WO 2004002625 A1	19-01-2004 08-01-2004 23-03-2005 13-10-2005 01-01-2004 15-01-2009 08-01-2004
-----				
EP 1374989	A2	02-01-2004	EP 1374989 A2 US 2003235520 A1 US 2006078463 A1	02-01-2004 25-12-2003 13-04-2006
-----				
US 2005009101	A1	13-01-2005	NONE	
-----				

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/053051

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. B01L3/00 B01L9/00 ADD.		
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) B01L		
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, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 02/41995 A1 (PYROSEQUENCING AB [SE]; SAMUELS ADRIAN JAMES [GB]; ANDERSSON HELEN [SE] 30 mai 2002 (2002-05-30) page 3, ligne 27 - ligne 35 page 5, ligne 27 - ligne 30 page 6, ligne 35 - page 7, ligne 6 page 8, ligne 26 - ligne 36 figures 1a, 5	1,2
X	US 2006/215155 A1 (WEBER LUTZ [DE]) 28 septembre 2006 (2006-09-28) alinéas [0021], [0041], [0042], [0047], [0051], [0053], [0054], [0076], [0077], [0101] figures 1-3, 7b	1-14
-----		
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> 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  28 janvier 2016	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  08/02/2016	
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  Bischoff, Laura	

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 2004/001779 A1 (ANDERSON CLIFFORD L [US] ET AL) 1 janvier 2004 (2004-01-01) le document en entier -----	1-12
A	EP 1 374 989 A2 (AGILENT TECHNOLOGIES INC [US]) 2 janvier 2004 (2004-01-02) le document en entier -----	1-12
A	US 2005/009101 A1 (BLACKBURN GARY [US]) 13 janvier 2005 (2005-01-13) le document en entier -----	1-12

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2015/053051

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0241995	A1	30-05-2002	AU 2390102 A WO 0241995 A1	03-06-2002 30-05-2002
-----				
US 2006215155	A1	28-09-2006	DE 10336849 A1 EP 1654065 A1 JP 4640549 B2 JP 2007501940 A US 2006215155 A1 WO 2005016529 A1	10-03-2005 10-05-2006 02-03-2011 01-02-2007 28-09-2006 24-02-2005
-----				
US 2004001779	A1	01-01-2004	AU 2003239267 A1 CA 2488644 A1 EP 1515802 A1 JP 2005531006 A US 2004001779 A1 US 2009018034 A1 WO 2004002625 A1	19-01-2004 08-01-2004 23-03-2005 13-10-2005 01-01-2004 15-01-2009 08-01-2004
-----				
EP 1374989	A2	02-01-2004	EP 1374989 A2 US 2003235520 A1 US 2006078463 A1	02-01-2004 25-12-2003 13-04-2006
-----				
US 2005009101	A1	13-01-2005	AUCUN	
-----				