



- (51) Classification internationale des brevets :
A61B 10/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01) *A61B 10/02* (2006.01)
G01N 33/552 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/IB2012/057387
- (22) Date de dépôt international :
17 décembre 2012 (17.12.2012)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1162530 29 décembre 2011 (29.12.2011) FR
- (71) Déposant : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES [FR/FR]; 25 rue Leblanc, Bâtiment "Le Ponant D", F-75015 Paris (FR).
- (72) Inventeurs : BOUAMRANI, Ali; 6 Boulevard Clémenceau, F-38000 Grenoble (FR). BERGER, François; 41 chemin de la Carronnerie, F-38240 Meylan (FR). COSNIER, Marie-Line; 28 bis rue Ampère, F-38000 Grenoble (FR).
- (74) Mandataires : PRIORI, Enrico et al; Cabinet Ores, 36 rue de St Pétersbourg, F-75008 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : DEVICE AND METHOD OF SAMPLING AND ANALYSING BIOLOGICAL OR BIOCHEMICAL SPECIES

(54) Titre : DISPOSITIF ET PROCÉDÉ DE PRÉLÈVEMENT ET ANALYSE D'ESPÈCES BIOLOGIQUES OU BIOCHIMIQUES.

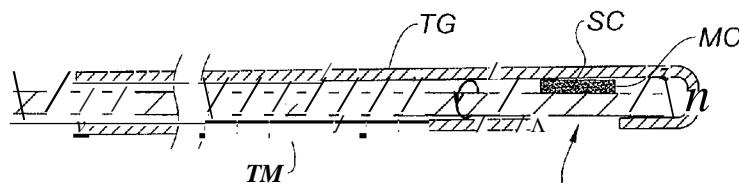


Fig. 8

(57) Abstract : A method of sampling biological or biochemical species, comprising the following steps: a) arranging a capture surface (SC) for said biological or biochemical species in contact with a biological tissue or fluid (TB); and b) rinsing said surface to remove biological or biochemical species that have not been adsorbed; the method being characterised in that said capture surface is the surface of a nanoporous material (MC). A method of analysing said biological or biochemical species, characterised by the use of said surface as an analysis support. The analysis may in particular be performed using a method selected from mass spectroscopy with laser desorption and fluorescence imaging. A device for sampling biological or biochemical species comprising a rod (TM) to which is attached a material (MC) having a capture surface (SC) for said biological or biochemical species, arranged so as to be able to be brought into contact with a biological tissue or fluid (TB), characterised in that said material is a nanoporous material. The rod can be slid into a guide tube to facilitate the insertion thereof into a human or animal body.

(57) Abrégé : Procédé de prélèvement d'espèces biologiques ou biochimiques comportant les étapes suivantes : a) disposer une surface de capture (SC) desdites espèces biologiques ou biochimiques en contact avec un tissu ou fluide biologique (TB); et b) rincer ladite surface pour éliminer les espèces biologiques ou biochimiques

[Suite sur la page suivante]

n'ayant pas été adsorbées; le procédé étant caractérisé en ce que ladite surface de capture est la surface d'un matériau nano-poreux (MC). Procédé d'analyse desdites espèces biologiques ou biochimiques, caractérisé par l'utilisation de ladite surface en tant que support d'analyse. L'analyse peut notamment être réalisée par une méthode choisie parmi la spectroscopie de masse avec désorption laser et l'imagerie de fluorescence. Dispositif de prélèvement d'espèces biologiques ou biochimiques comportant une tige (TM) à laquelle est fixé un matériau (MC) présentant une surface de capture (SC) desdites espèces biologiques ou biochimiques, agencée de manière à pouvoir être mise en contact avec un tissu (TB) ou fluide biologique, caractérisé en ce que ledit matériau est un matériau nano-poreux. La tige peut coulisser dans un tube guide pour faciliter son insertion dans un corps humain ou animal.

DISPOSITIF ET PROCÉDE DE PRELEVEMENT ET ANALYSE D'ESPECES BIOLOGIQUES OU BIOCHIMIQUES

L'invention porte sur un procédé de prélèvement d'espèces biologiques ou biochimiques, sur un procédé d'analyse d'espèces biologiques ou biochimiques et sur un dispositif de mise en œuvre de ces procédés.

Une des priorités de la recherche biomédicale est d'améliorer les analyses anatomo-pathologiques, histologiques et moléculaires. L'approche histologique conventionnelle se base sur des techniques de biopsie visant à prélever des échantillons de tissus biologiques. Ces techniques demeurent relativement intrusives, malgré les progrès rendus possibles par la miniaturisation des dispositifs de mise en œuvre. En outre, les procédures de préparation des tissus (fixation en paraffine, congélation...) sont peu compatibles avec les nouvelles approches d'investigation moléculaire. La fragilité des espèces biochimiques telles que l'ARN et les protéines est l'un des facteurs pré-analytiques qui explique l'échec relatif du transfert clinique des approches « poly-omiques » innovantes.

Par ailleurs les procédures actuelles, en raison de leur coût et du temps requis pour leur mise en œuvre, sont difficilement compatibles avec le besoin de disposer d'analyses extemporanées, c'est à dire réalisées au bloc opératoire pendant une intervention chirurgicale, afin d'aider les décisions du chirurgien. De plus, l'analyse histologique utilisant des colorations rapides ne permet pas toujours d'obtenir des informations suffisamment pertinentes.

Le document WO 2006/082344 décrit un dispositif de prélèvement moléculaire par contact comprenant un support ayant une face structurée à l'échelle micrométrique, se présentant par exemple sous la forme d'un réseau de micro-plots, ou bien de micro-cuvettes pouvant être remplies de micro-billes. Cette face, qui est de préférence fonctionnalisée, présente une surface développée relativement importante, susceptible de capturer par simple contact et de fixer des molécules d'intérêt contenues dans un tissu biologique. Le recours à une fonctionnalisation de la surface introduit des contraintes au niveau de la conservation du dispositif lors de son stockage et

au niveau de la stérilisation (les procédés de stérilisation conventionnels étant susceptibles d'affecter la fonctionnalisation). Et, en l'absence de fonctionnalisation, l'efficacité et la sélectivité de la capture sont insuffisantes.

L'invention vise à surmonter ces inconvénients de l'art
5 antérieur. Conformément à l'invention, ce résultat est atteint grâce à l'utilisation d'une surface de contact nano-poreuse, et en particulier en silicium nano-poreux. Les nano-pores permettent une adsorption efficace et relativement sélective d'espèces chimiques et biologiques, même en l'absence d'une fonctionnalisation de surface (bien qu'une fonctionnalisation
10 puisse être également prévue dans certains modes de réalisation, pour améliorer encore la sélectivité et/ou l'efficacité de la capture) ; cela est attribué à un phénomène de succion par les pores. Le document WO 201 1/025602 divulgue l'utilisation de matériaux nano-poreux - et notamment de silice nano-poreuse - pour le fractionnement, la stabilisation et le stockage de
15 biomolécules.

Un objet de l'invention est donc un procédé de prélèvement d'espèces biologiques ou biochimiques comportant les étapes suivantes :

a) disposer une surface de capture desdites espèces biologiques ou biochimiques en contact avec un tissu ou fluide biologique, de
20 telle sorte qu'au moins une espèce biologique ou biochimique soit adsorbée par ladite surface ; et

b) rincer ladite surface pour éliminer les espèces biologiques ou biochimiques n'ayant pas été adsorbées ;

dans lequel ladite étape a) ne présente pas un caractère
25 chirurgical ;

le procédé étant caractérisé en ce que ladite surface de capture est la surface d'un matériau nano-poreux.

Le tissu biologique peut être notamment un tissu autre qu'un tissu liquide tel que le sang. Il peut s'agir par exemple d'un épithélium, et
30 notamment d'un endothélium, ou d'un tissu conjonctif. Le fluide biologique (généralement un liquide) peut être notamment le sang entier, le plasma

sanguin, le liquide céphalo-rachidien, la salive, etc. Il peut s'agir de tissus ou fluides humains, animaux (non humains) et/ou végétaux.

On entend par « matériau nanoporeux » un matériau cristallin ou amorphe, d'un seul tenant et de préférence de composition homogène, 5 présentant des pores dont le diamètre moyen est inférieur à un micromètre et en particulier inférieur ou égal à 100 nm. On distingue notamment, parmi les matériaux nano-poreux, les matériaux microporeux (pores de diamètre moyen compris entre 0,2 et 2 nm), mésoporeux (pores de diamètre moyen compris entre 2 et 50 nm) et macroporeux (pores de diamètre moyen compris entre 50 10 et 1000 nm). De préférence la porosité (rapport du volume des pores au volume total) sera supérieure ou égale à 10%.

Les espèces biologiques adsorbées peuvent être des cellules (diamètre compris entre 1 μm et 50 μm environ), des bactéries, des virus, des vésicules circulantes comme les exosomes (diamètre compris entre 20 et 200 15 nm environ). Les espèces biochimiques adsorbées peuvent être molécules ou des macromolécules, telles que des protéines (diamètre compris entre quelques nanomètres et quelques dizaines de nanomètres), des peptides (taille de l'ordre du nanomètre), des métabolites. La « taille » de ces molécules s'entend comme leur plus grande dimension.

20 On considère qu'une opération ne présente pas un caractère chirurgical lorsqu'elle n'est pas intrusive, ou en tout cas lorsqu'elle ne représente pas une intervention physique substantielle sur le corps, ne nécessite d'une expertise médicale professionnelle et n'entraîne pas de risque substantiel pour la santé. D'une manière générale, ne présente pas un 25 caractère chirurgical toute opération consistant à mettre en contact la surface de capture avec l'épiderme, un tissu accessible par des passages ou ouvertures naturels (rectum, intérieur de la bouche, urètre, vessie...), ou bien par une simple pénétration de l'épiderme, voire par un cathéter intraveineux. Ne présente pas non plus un caractère chirurgical la mise en contact de la 30 surface de capture avec un tissu rendu accessible par une opération chirurgicale préalable (par exemple, introduction d'un cathéter, lorsque cette

opération est de nature chirurgicale) ou concomitante, mais réalisée de manière indépendante.

Le procédé peut comporter également une étape c) consistant à analyser les espèces biologiques ou biochimique adsorbées par ladite surface de capture, cette dernière étant utilisée comme support d'analyse. En particulier, ladite étape c) peut être mise en oeuvre par une méthode choisie parmi la spectroscopie de masse avec désorption laser et un procédé d'imagerie tel que l'imagerie de fluorescence. Notamment, ladite étape c) peut être mise en oeuvre par une méthode de spectroscopie de masse avec désorption laser de type MALDI (désorption/ionisation laser assistée par matrice) ou SELDI (désorption/ionisation laser amplifiée par une surface), une matrice organique étant déposée directement sur la surface de capture après ladite étape b) de rinçage. En variante, l'étape c) peut également être mise en oeuvre par une méthode de spectrométrie de diffusion Raman.

Le fait que le matériau de capture puisse servir comme support d'analyse constitue une caractéristique particulièrement avantageuse de l'invention. En effet, le transfert de la surface de capture vers un support d'analyse distinct pourrait abîmer les espèces biochimiques ou biologiques capturées, qui sont souvent très fragiles. En outre ce transfert serait une source de complexité, de coûts et de risques de contamination ou d'erreur. Par comparaison, dans le cas du document WO 2011/025602 précité, une étape d'éluion est nécessaire pour pouvoir analyser les molécules capturées et stabilisées.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé, ledit matériau nano-poreux peut être du silicium nano-poreux. Avantageusement, ledit silicium nano-poreux peut présenter au moins une des propriétés suivantes (et préférentiellement l'ensemble de ces propriétés) :

- des pores de structure dendritique ;
 - des pores de diamètre moyen compris entre 1 et 100 nm ;
- et
- une porosité comprise entre 40% et 65% sur une profondeur comprise entre 10 nm et 100 µm.

De préférence, ladite surface de capture n'est pas fonctionnalisée.

Ladite étape a) peut être effectuée *ex vivo*, sur un échantillon de tissu ou fluide biologique préalablement prélevé d'un organisme humain, animal ou végétal ; de préférence, il pourra s'agir d'un tissu « frais », c'est-à-dire n'ayant pas été soumis à un traitement de congélation ou fixation. En variante, ladite étape a) peut être effectuée *in vivo*, à la condition que cela n'implique pas une intervention physique substantielle sur le corps nécessitant une expertise médicale et comportant un risque substantiel pour la santé d'un patient - c'est-à-dire à la condition que cela n'implique pas une intervention de nature chirurgicale.

Un autre objet de l'invention est un procédé d'analyse d'espèces biologiques ou biochimiques préalablement adsorbées sur la surface d'un matériau nano-poreux, caractérisé par l'utilisation de ladite surface en tant que support d'analyse. En particulier, ladite analyse peut être réalisée par une méthode choisie parmi la spectroscopie de masse avec désorption laser et un procédé d'imagerie tel que l'imagerie de fluorescence. Notamment, ladite analyse peut être réalisée par une méthode de spectroscopie de masse avec désorption laser de type MALDI (désorption/ionisation laser assistée par matrice) ou SELDI (désorption/ionisation laser amplifiée par une surface), à l'aide d'une matrice organique déposée directement sur la surface du matériau nano-poreux. Il peut également s'agir de méthodes d'imagerie, telle l'imagerie de fluorescence ou la colorimétrie, ces analyses pouvant être précédées par l'ajout d'un marqueur adéquat dans le milieu. Il peut également s'agir d'une analyse par spectrométrie de diffusion Raman.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé, ledit matériau nano-poreux peut être du silicium nano-poreux. Avantageusement, ledit silicium nano-poreux peut présenter au moins une des propriétés suivantes (et préférentiellement l'ensemble de ces propriétés) :

- des pores de structure dendritique ;

- des pores de diamètre moyen compris entre 1 et 100 nm ;
et

- une porosité comprise entre 40% et 65% sur une profondeur comprise entre 10 nm et 100 µm.

5 De préférence, ladite surface de capture n'est pas fonctionnalisée.

Encore un autre objet de l'invention est un dispositif de prélèvement d'espèces biologiques ou biochimiques comportant une tige à laquelle est fixé un matériau présentant une surface de capture desdites
10 espèces biologiques ou biochimiques, agencée de manière à pouvoir être mise en contact avec un tissu ou fluide biologique, caractérisé en ce que ledit matériau est un matériau nano-poreux.

Selon un mode de réalisation préféré du dispositif, ledit matériau nano-poreux peut être du silicium nano-poreux.

15 Avantageusement, ledit silicium nano-poreux peut présenter au moins une des propriétés suivantes (et préférentiellement l'ensemble de ces propriétés) :

- des pores de structure dendritique ;
- des pores de diamètre moyen compris entre 1 et 100 nm ;

20 et

- une porosité comprise entre 40% et 65% sur une profondeur comprise entre 10 nm et 100 pm.

De préférence, ladite surface de capture n'est pas fonctionnalisée.

25 Ladite tige peut être placée à l'intérieur d'un tube guide présentant une ouverture latérale ou axiale, ladite tige pouvant être déplacée à l'intérieur dudit tube guide de manière à amener ladite surface de capture en correspondance de ladite ouverture. En particulier, ladite tige peut présenter un méplat auquel est fixé ledit matériau et ledit tube guide peut présenter une
30 ouverture latérale, la surface de capture pouvant être amenée en regard de ladite ouverture par rotation de la tige à l'intérieur du tube guide.

D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention assortiront à la lecture de la description faite en référence aux dessins annexés, donnés à titre d'exemple, dans lesquels :

5 - Les figures 1A - 1D illustrent schématiquement un dispositif et un procédé selon l'invention ;

- Les figures 2A - 2C et 3A, 3B montrent des vues au microscope électronique, respectivement de la tranche et de la surface, de différents échantillons de silicium nano-poreux pouvant convenir pour la mise en œuvre de l'invention ;

10 - Les figures 4, 5 et 6 montrent des spectres de masse de protéines obtenus en appliquant un procédé selon un mode de réalisation de l'invention à l'étude : du plasma sanguin humain, du liquide céphalo-rachidien humain et du tissu cérébral de souris, respectivement ;

15 - La figure 7 montre des images de fluorescence mettant en évidence la capture de cellules d'un tissu cérébral de souris à l'aide d'un dispositif selon l'invention ; et

- La figure 8 illustre un dispositif selon un mode de réalisation de l'invention.

20 La figure 1A illustre schématiquement un dispositif selon un mode de réalisation de l'invention, constitué par une plaquette MC d'un matériau de capture, de type nano-poreux, fixée - de préférence de manière amovible - sur une tige de manipulation TM. La plaquette du matériau de capture présente, à l'opposé de sa surface de fixation à la tige TM, une surface de capture nano-poreuse SC, ayant typiquement une dimension
25 comprise entre 0,5 et 5 cm². Le matériau de capture peut être du silicium nano-poreux, et plus particulièrement mésoporeux.

30 Comme illustré sur la figure 1B, la tige TM est utilisée pour amener la surface de capture SC en contact avec un tissu biologique TB. Il peut s'agir d'un échantillon de tissu préalablement prélevé d'un corps humain ou animal, voire d'un organisme végétal (*ex vivo*), ou bien d'un tissu *in vivo*. La mise en contact peut se faire par simple apposition, sans qu'il soit

nécessaire de frotter le tissu ou d'appliquer une pression élevée. Cela est important, surtout pour les applications *in vivo*.

En variante, le matériau de capture pourrait être immergé dans un fluide biologique, ou une gouttelette dudit fluide pourrait être déposée
5 sur la surface de capture.

La surface de capture en silicium nano-poreux est lisse au toucher et ne présente pas d'aspérités significative. Ainsi le risque de lésion du tissu est minimisé, ce qui est très avantageux pour les applications *in vivo*. Le prélèvement des espèces biologiques ou biochimiques n'est donc pas
10 réalisé par micro-abrasion, ni par fonctionnalisation chimique, mais par un effet de succion dû aux nano-pores. Cet effet conduit à une fixation préférentielle des peptides et des « petites » protéines, présentant une taille de l'ordre de 1 à 5 nm environ, et/ou une masse comprise entre 5000 et 20.000 Da environ. Cela est avantageux, car ces « petites » protéines sont
15 généralement plus utiles en tant que marqueurs que des molécules de plus grandes dimensions. L'effet de succion explique également l'adhésion des cellules, qui sont trop grandes pour pouvoir pénétrer dans les pores.

Ensuite (figure 1C) le dispositif est éloigné du tissu, et la surface de capture est rincée, par exemple par immersion dans l'eau, ou à
20 l'aide d'une solution tampon, ce qui permet d'éliminer les espèces biologiques ou biochimiques n'ayant pas été adsorbées par la surface, et donc n'adhérant pas forcément à elle. Ce rinçage permet de révéler le caractère sélectif de l'adsorption par la surface nano-poreuse.

Enfin, la plaquette MC de matériau de capture est
25 désolidarisée de la tige (bien que cela ne soit pas toujours nécessaire) et introduite dans un appareillage d'analyse AA, permettant d'analyser les espèces biologiques ou biochimique adsorbées par la surface de capture. Typiquement, les analyses pourront être effectuées par spectroscopie de masse avec désorption laser, de type MALDI ou SELDI. Dans ce cas, il sera
30 nécessaire de déposer sur la surface de capture une matrice organique adaptée. En variante ou en complément, il sera possible d'effectuer des analyses par imagerie de fluorescence. En tout cas, le matériau de capture

MC sert directement de support d'analyse. Pour les analyses avec désorption et ionisation laser, il est nécessaire que le matériau de capture soit conducteur - ce qui est le cas du silicium nano-poreux dopé.

Comme cela a été dit plus haut, le matériau de capture utilisé de manière préférentielle est le silicium nano-poreux, même s'il est tout à fait possible d'utiliser d'autres matériaux nano-poreux.

Du silicium nano-poreux (et plus précisément mésoporeux) peut être obtenu par anodisation électrochimique de silicium dopé p+ de conductivité de 10 à 20 $m\Omega \cdot cm^{-1}$ dans une solution d'acide fluorhydrique à environ 15%. Pour ce faire, le matériau est trempé dans un bain d'HF est soumis à une électrolyse, ce procédé étant connu. On obtient de cette façon un matériau présentant une porosité de structure dendritique ; cela signifie que les pores n'ont pas un axe rectiligne ; ils s'étendent dans la profondeur du matériau selon une direction discontinue, et peuvent se croiser. Cette structure dendritique favorise la succion. La porosité (rapport du volume des pores sur le volume total) est comprise entre 40 et 65%. La porosité s'étend sur une profondeur d'environ $6\mu m$. Au-delà, on retrouve le silicium massif. D'une façon générale, dans cette invention, la porosité du matériau peut s'étendre sur une profondeur pouvant être comprise entre 10 nm et 100 μm .

En faisant varier les paramètres de fabrication (concentration en HF, temps d'anodisation, densité de courant, type de silicium) on peut faire varier ces caractéristiques aisément.

En variante, il est possible de réaliser du silicium nano-poreux présentant une structure ordonnée au moyen d'un processus de lithographie électronique.

Les figures 2A, 2B et 2C montrent des images de microscopie électronique de la tranche d'un échantillon de silicium nano-poreux obtenu par le procédé d'anodisation électrochimique décrit ci-dessus. Les figures présentent des grossissements différents ; en particulier, la figure 2B met en évidence la transition nette entre silicium massif et silicium nano-poreux, tandis que la figure 2C permet d'apprécier la structure dendritique des pores.

Les figures 3A et 3B montrent des images de microscopie électronique de la surface de deux échantillons de silicium nano-poreux obtenus par anodisation électrochimique dans des conditions différentes.

Le dispositif et le procédé de l'invention ont été testés au
5 moyen de trois essais *ex vivo*.

Dans un premier essai, 5 μ l de plasma sanguin humain ont été déposés directement sur la surface de capture en silicium nano-poreux. Ensuite, la surface a été rincée deux fois à l'aide d'un tampon acide (Acétate de Sodium 100mM, pH 4,0) pendant 1 min. Le silicium présentant une charge
10 de surface légèrement chargée négativement, on utilise une solution tampon dont le pH est ajusté pour favoriser une charge positive des protéines de l'échantillon que l'on souhaite collecter. Autrement dit, le pH est ajusté en fonction du point isoélectrique des protéines d'intérêt. On rappelle que le point isoélectrique d'une protéine correspond à la valeur de pH pour laquelle la
15 charge électrique de ladite protéine est nulle. Ce rinçage permet d'éliminer les espèces n'ayant pas adhéré à la surface de capture, ou des impuretés (résidus de tissu, sang...). Ensuite, la surface a été rincée encore une fois dans l'eau, puis elle a été séchée à l'air libre. Une matrice organique (acide sinapinique) a été déposée sur la surface de capture, qui a ensuite été
20 soumise à une analyse MALDI au moyen d'un spectromètre de masse MALDI du commerce (Bruker Autoflex). L'acquisition automatique des spectres a été réalisée sur 5400 impacts laser répartis régulièrement pour chaque échantillon. L'analyse a été effectuée en mode linéaire (ce qui signifie que les protéines décrivent une trajectoire linéaire dans le spectromètre de masse)
25 avec une intensité de 55 (réglage de l'appareil), avec une atténuation du signal de matrice à 1000 Da.

Les résultats sont représentés sur la figure 4, où m/z est le rapport masse/charge (en Dalton/unités élémentaires de charge) et l'axe des abscisses représente l'intensité du signal de spectroscopie de masse (unités
30 arbitraires). Le graphique inférieur correspond à l'utilisation du matériau nano-poreux, conformément à l'invention ; le graphique supérieur sert de référence et a été obtenu en utilisant un porte-substrat du type normalement utilisé en

spectrométrie de masse (barrette métallique lisse sur laquelle est déposé un polymère), dont la référence est Biorad CM10. Les mesures sur le support de référence ont été réalisées selon le même protocole que celles sur la surface de silicium nano-poreux.

5 On observe que les espèces caractérisées par un rapport $m/z > 10000$ - et notamment l'albumine, constituant abondant et peu intéressant pour établir un diagnostic - ne sont pas détectées lorsqu'on utilise une surface de capture en silicium nano-poreux, ce qui démontre la sélectivité de la capture. Inversement, on observe un enrichissement des pics
10 correspondant aux protéines de faible masse ; dans le cas du support lisse, au contraire, ces protéines sont en grande partie éliminées par le rinçage.

On observe également que les spectres sont plus riches sur les pics correspondant à des protéines de faible masse, ce qui confirme une bonne adhésion des petites protéines sur la surface nano-poreuse, en dépit
15 des opérations de rinçages. Sur le support de contrôle, lisse, les petites protéines sont en grande partie éliminées par le rinçage.

Dans un deuxième essai, 10 μ l de liquide céphalo-rachidien humain ont été déposés directement sur la surface de capture en silicium nano-poreux, du même type que celle utilisée pour le premier essai. Ensuite,
20 la surface a été rincée deux fois à l'aide d'un tampon acide (Acétate de Sodium 100mM, pH 4,0) pendant 1 min. Ce rinçage permet d'éliminer les espèces n'ayant pas adhéré à la surface de capture, ou des impuretés (résidus de tissu, sang...). Ensuite, la surface a été rincée encore une fois dans l'eau, puis elle a été séchée à l'air libre. Une matrice organique (acide
25 sinapinique pour l'analyse des protéines, CHCA, c'est-à-dire acide α -cyano-4-hydroxycinnamique, pour l'analyse des peptides) a été déposée sur la surface de capture, qui a ensuite été soumise à une analyse au moyen d'un spectromètre de masse SELDI du commerce (Biorad PCS 4000).

Les paramètres de lecture ont été réglés en fonction de
30 l'échelle de masse des espèces à détecter. Les conditions optimales ont été déterminées manuellement sur quelques spots avant de lancer l'acquisition

automatique sur 583 impacts laser répartis régulièrement pour chaque échantillon :

Pour les peptides (bas poids moléculaires), on a utilisé une intensité de 1000 nJ et une atténuation du signal de matrice à 500 Da.

5 Pour les protéines (hauts poids moléculaires) on a utilisé une intensité de 2200 nJ et une atténuation du signal de matrice à 1000 Da.

Comme dans le cas du premier essai, la même analyse a été effectuée également en utilisant un porte-substrat lisse Biorad CM10.

10 Les résultats sont représentés sur la figure 5, où les graphiques supérieurs ont été obtenus avec le substrat lisse de référence et les graphiques supérieurs ont été obtenus avec une surface de capture nano-poreuse, conformément à l'invention. Concernant les protéines, on confirme les résultats du premier essai : les « petites » protéines sont fixées efficacement tandis qu'on observe une élimination substantielle des
15 « grandes » protéines, et notamment de l'albumine. La différence entre les deux supports est encore plus considérable dans le cas des peptides : ces derniers sont largement éliminés par rinçage dans le cas du support lisse, alors que dans le cas du support nano-poreux on observe un spectre très riche. Les mesures sur le support de référence ont été réalisées selon le
20 même protocole que celles sur la surface de silicium nano-poreux.

Dans un troisième essai, un échantillon de tissu cérébral frais de souris a été apposé sur la surface de capture en silicium nano-poreux, du même type que celle utilisée pour le premier et le deuxième essai. Ensuite, la surface a été rincée deux fois à l'aide d'un tampon acide (Acétate de Sodium
25 100mM, pH 4,0) pendant 1 min. Ce rinçage permet d'éliminer les espèces n'ayant pas adhéré à la surface de capture, ou des impuretés (résidus de tissu, sang...). Ensuite, la surface a été rincée encore une fois dans l'eau, puis elle a été séchée à l'air libre.

30 Les cellules capturées ont été mises en évidence par imagerie de fluorescence, grâce à l'ajout d'un intercalant de l'ADN (tampon Hoechst) - voir figure 7. Cette figure révèle la présence de cellules sur la surface de capture après rinçage.

Une matrice organique (acide sinapinique) a été déposée sur la surface de capture, qui a ensuite été soumise à une analyse au moyen d'un spectromètre de masse SELDI du commerce (Biorad PCS 4000). Les résultats sont représentés sur la figure 4, où m/z est le rapport masse/charge (en Dalton/unités élémentaires de charge) et l'axe des abscisses représente l'intensité du signal de spectroscopie de masse (unités arbitraires). Encore une fois, on observe un spectre de masse très riche dans la région 5000 - 10000 Da.

La figure 8 (qui n'est pas à l'échelle) illustre un mode de réalisation d'un dispositif de l'invention qui est particulièrement adapté aux applications in vivo.

Dans ce dispositif, la tige TM est flexible et présente un diamètre de 500 μm et une longueur de 20 cm. A environ 1 cm de son extrémité se trouve un méplat long 2 cm, où est fixé, de manière amovible, le matériau de capture MC. La tige coulisse dans un tube guide ou cathéter TG en matériau biocompatible, présentant un diamètre externe de 1 mm et une paroi de 50 μm d'épaisseur. L'extrémité distale du tube est fermée ; à une distance d'environ 1 cm de cette dernière, une ouverture latérale OL est ménagée sur une longueur de 2 cm. Initialement, comme illustré par la figure, la tige est agencée de telle manière que la surface de capture SC soit écartée de l'ouverture. Le tube guide avec la tige est introduit dans le corps d'un patient, jusqu'à ce que l'ouverture OL se trouve en regard du tissu à analyser. Une rotation de 180° de la tige autour de son axe à l'intérieur du tube permet d'amener la surface de capture SC en correspondance de ladite ouverture, et donc en contact avec le tissu. Une autre rotation de 180° amène la surface de capture dans sa position initiale. Ensuite, l'ensemble tube-guide est extrait du corps du patient, le matériau de capture est désolidarisé de la tige et soumis aux étapes de rinçage et analyse comme décrit ci-dessus. En variante, le tube guide peut avoir été introduit préalablement dans le corps du patient ; dans ce cas, il est seulement nécessaire d'introduire la tige dans le tube, effectuer la double rotation et l'extraire.

En variante, le tube peut présenter une ouverture axiale, au niveau de son extrémité distale. Dans ce cas, la surface de capture est amenée en contact avec le tissu par un mouvement d'avancée de la tige.

- Il est entendu que d'autres dispositifs peuvent être utilisés
- 5 pour réaliser une analyse *in vivo* conformément à l'invention.

REVENDICATIONS

1. Procédé de prélèvement et d'analyse d'espèces biologiques ou biochimiques comportant les étapes suivantes :

5 a) disposer une surface de capture (SC) desdites espèces biologiques ou biochimiques en contact avec un tissu ou fluide biologique (TB), de telle sorte qu'au moins une espèce biologique ou biochimique soit adsorbée par ladite surface, ladite surface de capture étant la surface d'un matériau nano-poreux ; et

10 b) rincer ladite surface pour éliminer les espèces biologiques ou biochimiques n'ayant pas été adsorbées ;
dans lequel ladite étape a) ne présente pas un caractère chirurgical ;

le procédé étant caractérisé en ce qu'il comporte également
15 une étape :

c) consistant à analyser les espèces biologiques ou biochimique adsorbées par ladite surface de capture, cette dernière étant utilisée comme support d'analyse.

20 2. Procédé selon la revendication 1 dans lequel ladite étape c) est mise en œuvre par une méthode choisie parmi :

- la spectroscopie de masse avec désorption laser ; et
- une technique d'imagerie, telle que l'imagerie de
fluorescence.

25 3. Procédé selon la revendication 2 dans lequel dans lequel ladite étape c) est mise en œuvre par une méthode de spectroscopie de masse avec désorption laser de type MALDI ou SELDI, une matrice organique étant déposée directement sur la surface de capture après ladite étape b) de
30 rinçage.

4. Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel ledit matériau nano-poreux est du silicium nano-poreux.

5. Procédé selon la revendication 4 dans lequel ledit matériau nano-poreux est du silicium nano-poreux présentant au moins une des propriétés suivantes :

- des pores de structure dendritique ;
- des pores de diamètre moyen compris entre 1 et 100 nm ;

et

10 - une porosité comprise entre 40% et 65% sur une profondeur comprise entre 10 nm et 100 μ m.

6. Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel ladite surface de capture n'est pas fonctionnalisée.

15

7. Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel ladite étape a) est effectuée *ex vivo*, sur un échantillon de tissu ou fluide biologique préalablement prélevé d'un organisme humain, animal ou végétal.

20

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6 dans lequel ladite étape a) est effectuée *in vivo*, sans que cela n'implique une intervention physique substantielle sur le corps nécessitant une expertise médicale et comportant un risque substantiel pour la santé d'un patient.

25

9. Procédé d'analyse d'espèces biologiques ou biochimiques préalablement adsorbées sur la surface (SC) d'un matériau nano-poreux (MC), caractérisé par l'utilisation de ladite surface en tant que support d'analyse.

30

10. Procédé selon la revendication 9 dans lequel ladite analyse est réalisée par une méthode choisie parmi :

- la spectroscopie de masse avec désorption laser ; et
- une technique d'imagerie, telle que l'imagerie de fluorescence.

5 11. Procédé selon la revendication 10 dans lequel ladite analyse est réalisée par une méthode de spectroscopie de masse avec désorption laser de type MALDI ou SELDI à l'aide d'une matrice organique déposée directement sur la surface du matériau nano-poreux.

10 12. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11 dans lequel ledit matériau nano-poreux est du silicium nano-poreux.

 13. Procédé selon la revendication 12 dans lequel ledit matériau nano-poreux est du silicium nano-poreux présentant au moins une
15 des propriétés suivantes :

- des pores de structure dendritique ;
- des pores de diamètre moyen compris entre 1 et 100 nm ;

et

 - une porosité comprise entre 40% et 65% sur une
20 profondeur comprise entre 10 nm et 100 µm.

 14. Procédé selon l'une des revendications 9 à 13 dans lequel ladite surface n'est pas fonctionnalisée.

25 15. Dispositif de prélèvement d'espèces biologiques ou biochimiques comportant une tige (TM) à laquelle est fixé un matériau (MC) présentant une surface de capture (SC) desdites espèces biologiques ou biochimiques, agencée de manière à pouvoir être mise en contact avec un tissu (TB) ou fluide biologique, caractérisé en ce que ledit matériau est un
30 matériau nano-poreux.

16. Dispositif selon la revendication 15, dans lequel ledit matériau nano-poreux est du silicium nano-poreux.

17. Dispositif selon la revendication 16, dans lequel ledit
5 matériau nano-poreux est du silicium nano-poreux présentant au moins une des propriétés suivantes :

- des pores de structure dendritique ;
- des pores de diamètre moyen compris entre 1 et 100 nm ;

et

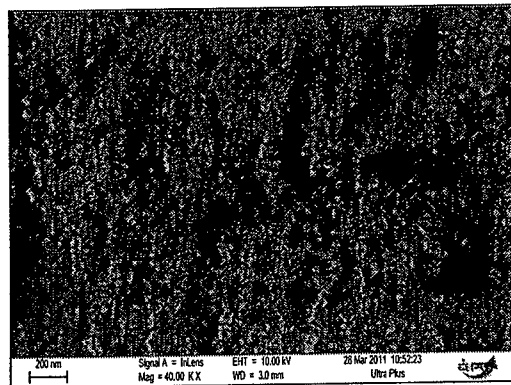
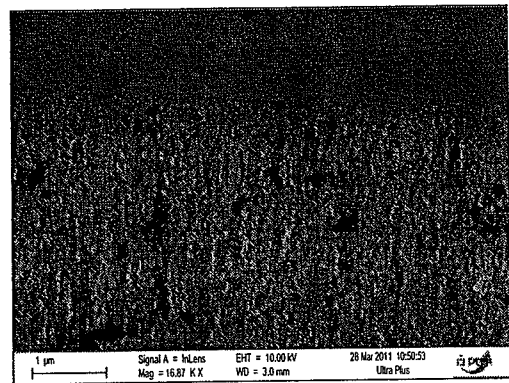
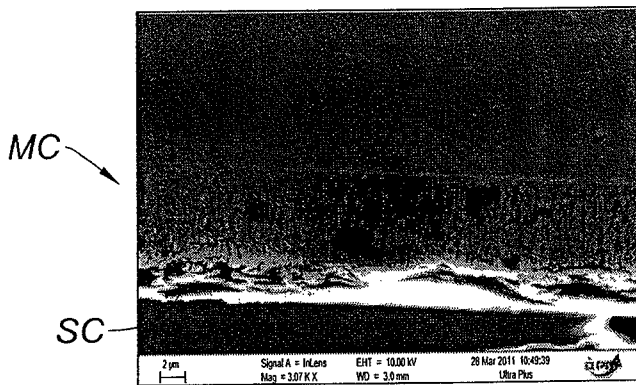
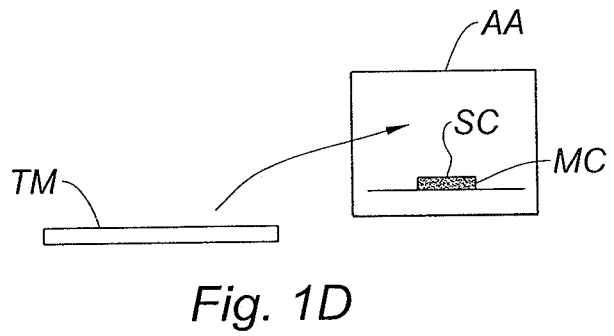
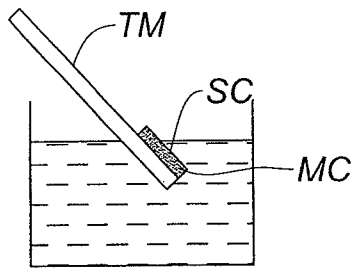
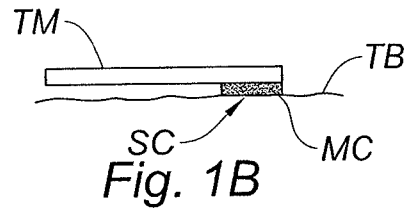
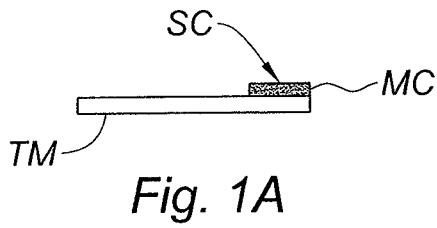
10 - une porosité comprise entre 40% et 65% sur une profondeur comprise entre 10 nm et 100 μm .

18. Dispositif selon l'une des revendications 15 à 17, dans lequel ladite surface de capture n'est pas fonctionnalisée.

15

19. Dispositif selon l'une des revendications 15 à 18 dans lequel ladite tige est placée à l'intérieur d'un tube guide (TG) présentant une ouverture latérale (OL) ou axiale, ladite tige pouvant être déplacée à l'intérieur dudit tube guide de manière à amener ladite surface de capture en
20 correspondance de ladite ouverture.

20. Dispositif selon la revendication 19 dans lequel ladite tige présente un méplat auquel est fixé ledit matériau et ledit tube guide présente une ouverture latérale, la surface de capture pouvant être amenée en regard
25 de ladite ouverture par rotation de la tige à l'intérieur du tube guide.



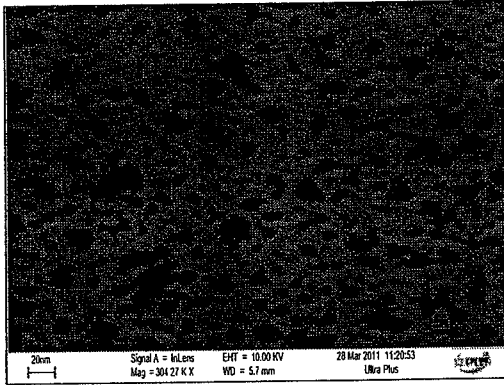


Fig. 3A

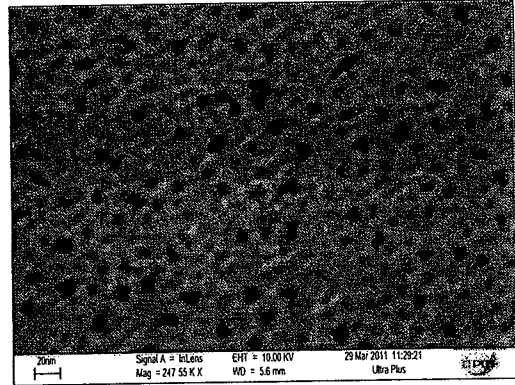


Fig. 3B

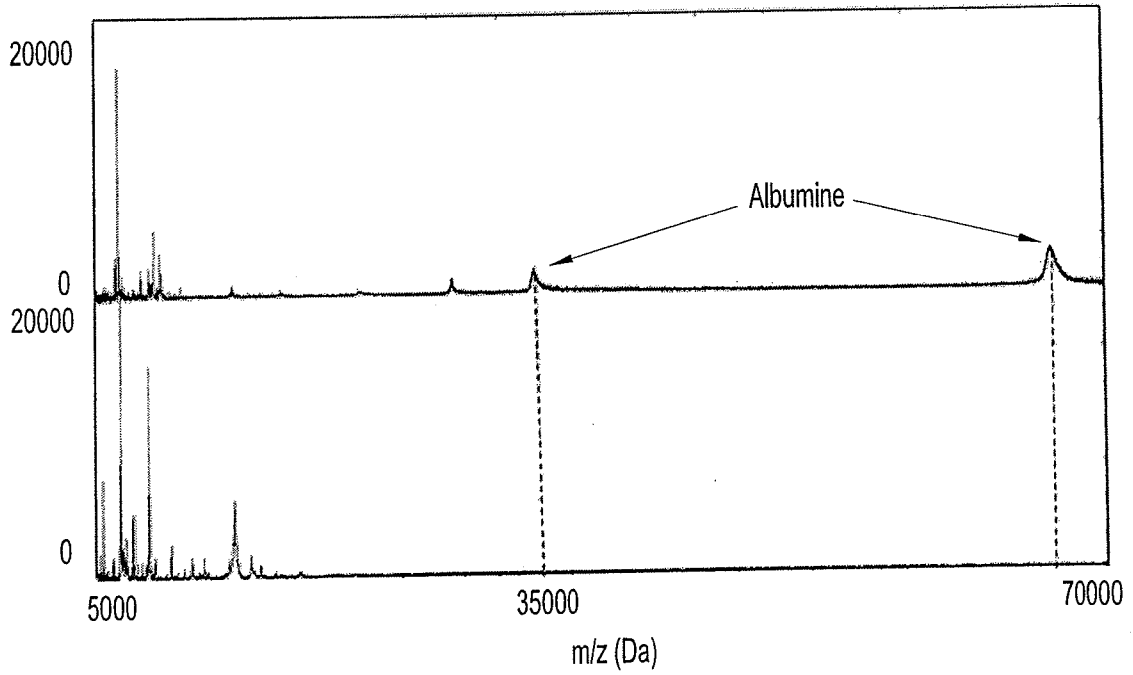


Fig. 4

3 / 4

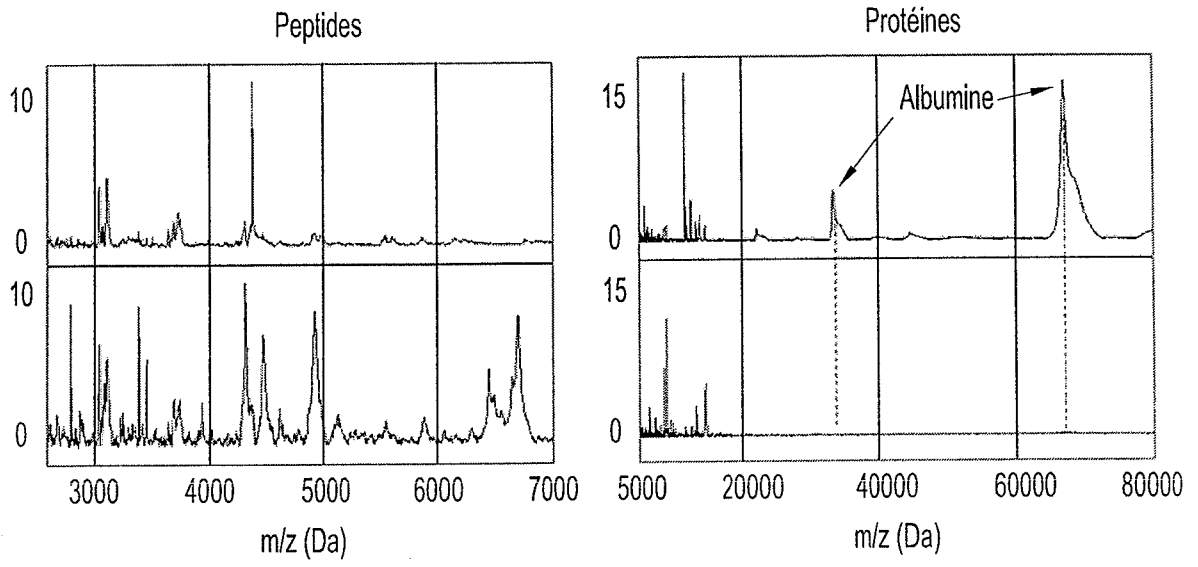


Fig. 5

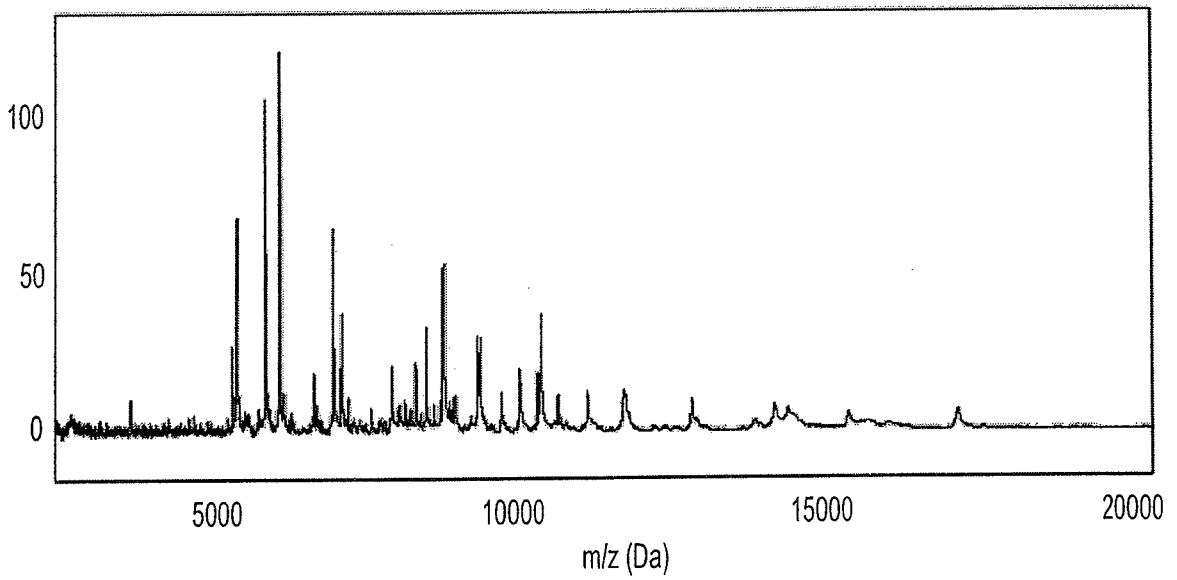


Fig. 6

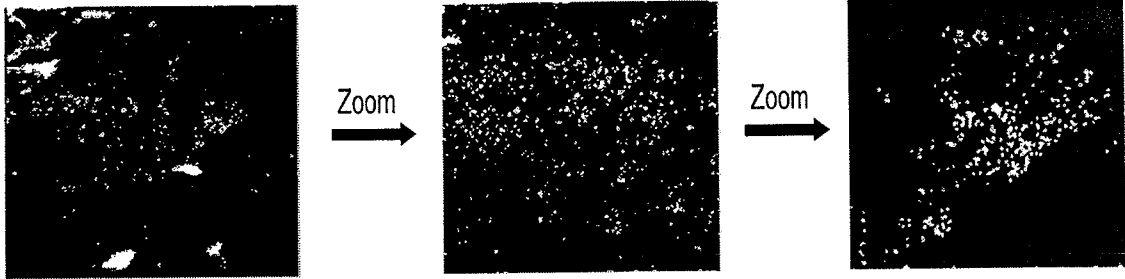


Fig. 7

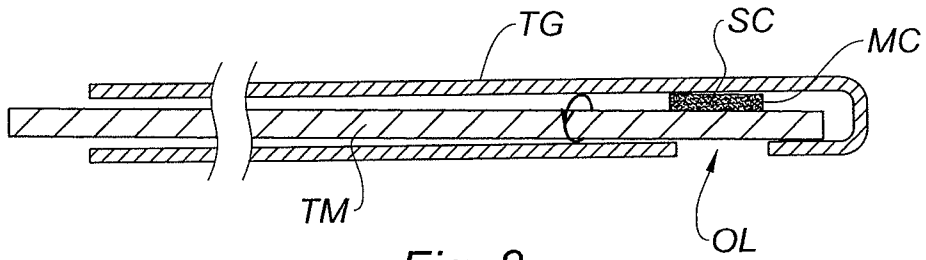


Fig. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/057387

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61B10/00 G01N21/64 G01N33/552 G01N33/68 A61B10/02
 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)
 G01N 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 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 2011/025602 AI (UNIV TEXAS [US] ; FERRARI MAURO [US] ; LIU XUEWU [US] ; TASCIOTTI ENNIO [] 3 March 2011 (2011-03-03)	1-14
Y	paragraphs [0086] , [0090] ; claims 41,52-55 ,60	15-20
Y	US 2011/213270 AI (PISON ULRICH [DE]) 1 September 2011 (2011-09-01) paragraphs [0005] , [0018] ; figures 1,4	15-20
A	Wo 2006/131400 AI (GI LUPI GMBH [DE] ; PISON ULRICH [DE] ; GI ERSIG MICHAEL [DE] ; SCHAEFER AX) 14 December 2006 (2006-12-14) the whole document	1, 15

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Spécial catégories of cited documents :

"A" document defining the général 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 spécial 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 27 March 2013	Date of mailing of the international search report 04/04/2013
---	---

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 Louka, Mari a
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/IB2012/057387

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
Wo 2011025602 AI	03-03-2011	US 2011065207 AI Wo 2011025602 AI	17-03-2011 03-03-2011

US 2011213270 AI	01-09-2011	CN 102149333 A DE 112009003237 A5 EP 2346410 AI JP 2012501693 A US 2011213270 AI wo 2010025719 AI	10-08-2011 05-07-2012 27-07-2011 26-01-2012 01-09-2011 11-03-2010

Wo 2006131400 AI	14-12-2006	AT 519110 T AU 2006256859 AI BR PI0611821 A2 CA 2609573 AI CN 101305280 A US 2008213130 AI US 2009131274 AI wo 2006131400 AI	15-08-2011 14-12-2006 20-12-2011 14-12-2006 12-11-2008 04-09-2008 21-05-2009 14-12-2006

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2012/057387

<p>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61B10/00 G01N21/64 G01N33/552 G01N33/68 A61B10/02 ADD.</p>																
<p>Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB</p>																
<p>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</p> <p>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N A61B</p> <p>Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche</p> <p>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</p>																
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Catégorie*</th> <th>Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents</th> <th>no. des revendications visées</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td> Wo 2011/025602 AI (UNIV TEXAS [US] ; FERRARI MAURO [US] ; LIU XUEWU [US] ; TASCOTTI ENNIO [] 3 mars 2011 (2011-03-03) alinéas [0086] , [0090] ; revendications 41,52-55 ,60 ----- </td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td> ----- US 2011/213270 AI (PISON ULRICH [DE]) 1 septembre 2011 (2011-09-01) alinéas [0005] , [0018] ; figures 1,4 ----- </td> <td>15-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td> ----- US 2011/213270 AI (PISON ULRICH [DE]) 1 septembre 2011 (2011-09-01) alinéas [0005] , [0018] ; figures 1,4 ----- </td> <td>15-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td> Wo 2006/131400 AI (GI LUPI GMBH [DE] ; PISON ULRICH [DE] ; GI ERSIG MICHAEL [DE] ; SCHAEFER AX) 14 décembre 2006 (2006-12-14) le document en entier ----- </td> <td>1, 15</td> </tr> </tbody> </table>		Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées	X	Wo 2011/025602 AI (UNIV TEXAS [US] ; FERRARI MAURO [US] ; LIU XUEWU [US] ; TASCOTTI ENNIO [] 3 mars 2011 (2011-03-03) alinéas [0086] , [0090] ; revendications 41,52-55 ,60 -----	1-14	Y	----- US 2011/213270 AI (PISON ULRICH [DE]) 1 septembre 2011 (2011-09-01) alinéas [0005] , [0018] ; figures 1,4 -----	15-20	Y	----- US 2011/213270 AI (PISON ULRICH [DE]) 1 septembre 2011 (2011-09-01) alinéas [0005] , [0018] ; figures 1,4 -----	15-20	A	Wo 2006/131400 AI (GI LUPI GMBH [DE] ; PISON ULRICH [DE] ; GI ERSIG MICHAEL [DE] ; SCHAEFER AX) 14 décembre 2006 (2006-12-14) le document en entier -----	1, 15
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées														
X	Wo 2011/025602 AI (UNIV TEXAS [US] ; FERRARI MAURO [US] ; LIU XUEWU [US] ; TASCOTTI ENNIO [] 3 mars 2011 (2011-03-03) alinéas [0086] , [0090] ; revendications 41,52-55 ,60 -----	1-14														
Y	----- US 2011/213270 AI (PISON ULRICH [DE]) 1 septembre 2011 (2011-09-01) alinéas [0005] , [0018] ; figures 1,4 -----	15-20														
Y	----- US 2011/213270 AI (PISON ULRICH [DE]) 1 septembre 2011 (2011-09-01) alinéas [0005] , [0018] ; figures 1,4 -----	15-20														
A	Wo 2006/131400 AI (GI LUPI GMBH [DE] ; PISON ULRICH [DE] ; GI ERSIG MICHAEL [DE] ; SCHAEFER AX) 14 décembre 2006 (2006-12-14) le document en entier -----	1, 15														
<p><input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</p>																
<p><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</p>																
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>																
<p>Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée</p> <p>27 mars 2013</p>	<p>Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale</p> <p>04/04/2013</p>															
<p>Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale</p> <p>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016</p>	<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p>Louka, Mari a</p>															

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/IB2012/057387

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
Wo 2011025602 AI	03-03-2011	US 2011065207 AI	17-03-2011
		Wo 2011025602 AI	03-03-2011

US 2011213270 AI	01-09-2011	CN 102149333 A	10-08-2011
		DE 112009003237 A5	05-07-2012
		EP 2346410 AI	27-07-2011
		JP 2012501693 A	26-01-2012
		US 2011213270 AI	01-09-2011
		wo 2010025719 AI	11-03-2010

Wo 2006131400 AI	14-12-2006	AT 519110 T	15-08-2011
		AU 2006256859 AI	14-12-2006
		BR PI0611821 A2	20-12-2011
		CA 2609573 AI	14-12-2006
		CN 101305280 A	12-11-2008
		US 2008213130 AI	04-09-2008
		US 2009131274 AI	21-05-2009
		wo 2006131400 AI	14-12-2006
