

(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
2 décembre 2010 (02.12.2010)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/136712 A1

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/543 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2010/050998

(22) Date de dépôt international :
25 mai 2010 (25.05.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0953427 25 mai 2009 (25.05.2009) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I [FR/FR]; 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3 Rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). **ECOLE CENTRALE DE LYON** [FR/FR]; 36, Avenue Guy de Collongue, F-69134 Ecully Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
JAFFREZIC, Nicole [FR/FR]; 10 Chemin des Bruyères, F-69130 Ecully (FR). **RENAUD, Louis** [FR/FR]; 87 Rue de Muhlheim, F-69800 Saint-Priest (FR). **HASSEN, Walid** [TN/FR]; 2, Place de Paris, F-69009 Lyon (FR).

(74) Mandataire : **SARLIN, Laure**; Cabinet BEAU DE LOMENIE, 51 Avenue Jean Jaurès, B.P. 7073, F-69301 Lyon Cedex 07 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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 : METHOD FOR DETECTING TARGET COMPOUNDS ON THE BASIS OF CAPILLARITY

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION DE COMPOSES CIBLES BASE SUR LA CAPILLARITE

(57) Abstract : The present invention relates to a method for detecting a target compound of interest in a sample, including the following steps: a) placing a solution containing nanoparticles having at least one probe compound that has at least one recognition function or recognition site enabling the same to react or interact with the target compound of interest; b) contacting the solution containing the nanoparticles having at least one probe compound with the sample of interest; c) recovering the nanoparticles having at least one probe compound that may have reacted with the target compound, to redisperse the recovered nanoparticles in a reference solution; d) placing the solution obtained in step c) at one point in a channel and measuring the time for the solution to reach another given point in the channel by capillary filling; e) and comparing the time measured with a reference time in order to assess the presence or absence of the target compound.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de détection d'un composé cible d'intérêt dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes : a) disposer d'une solution contenant des nanoparticules porteuses d'au moins un composé sonde, qui possède au moins une fonction ou site de reconnaissance lui permettant de réagir ou interagir avec le composé cible d'intérêt, b) mettre en contact la solution contenant des nanoparticules porteuses d'au moins un composé sonde, avec l'échantillon d'intérêt, c) récupérer les nanoparticules porteuses d'au moins un composé sonde, susceptible d'avoir réagi avec le composé cible, redisperser les nanoparticules récupérées dans une solution de référence, d) disposer la solution obtenue à l'étape c) en un point d'un canal et mesurer le temps que met la solution pour atteindre, par remplissage capillaire, un autre point donné du canal, e) comparer le temps mesuré avec un temps de référence, pour conclure à la présence ou à l'absence du composé cible.

WO 2010/136712 A1

PROCEDE DE DETECTION DE COMPOSES CIBLES BASE SUR LA CAPILLARITE

La présente invention concerne une nouvelle méthode de détection de composés cibles, pouvant être utilisée dans différents domaines, par exemple dans le domaine diagnostique, agroalimentaire, environnemental, industriel.

5 Dans ces différents secteurs, il est très souvent recherché des méthodes permettant de détecter la présence d'un composé cible, dans un échantillon. Dans le cas où le composé cible correspond à un ligand biologique, sa reconnaissance est, par exemple, réalisée grâce à une réaction antigène-anticorps (immunodétection) ou grâce à une réaction d'hybridation
10 avec l'oligonucléotide complémentaire. Afin de quantifier cette reconnaissance, les techniques actuelles ont, le plus souvent, recours à un marquage par une sonde fluorescente, soit des brins d'ADN contenus dans l'échantillon (puces à ADN), soit de l'anticorps complémentaire de l'antigène contenu dans l'échantillon (tests ELISA, tests western blot). La détection par
15 fluorescence permet d'atteindre de basses limites de détection, mais elle nécessite des réactifs marqués chers et présente certains artefacts, en particulier le photoblanchiment des sondes fluorescentes. D'autres tests par immunoagglutination sur latex ont également été développés, mais le temps de réponse est relativement long.

20 Un des objectifs de l'invention est de proposer une nouvelle méthode permettant la détection, voire même de quantification si besoin, d'un composé cible d'intérêt, par exemple d'un ligand biologique, dans des échantillons notamment biologiques, agroalimentaires ou environnementaux.

Le procédé selon l'invention se doit d'être rapide, fiable, facile à mettre
25 en œuvre et avantageux économiquement.

Dans ce contexte, la présente invention concerne un procédé de détection d'un composé cible d'intérêt dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

a) disposer d'une solution contenant des nanoparticules porteuses d'au
30 moins un composé sonde, qui possède au moins une fonction ou site de reconnaissance lui permettant de réagir ou interagir avec le composé cible d'intérêt,

- b) mettre en contact la solution contenant des nanoparticules porteuses d'au moins un composé sonde, avec l'échantillon d'intérêt,
- c) récupérer les nanoparticules porteuses d'au moins un composé sonde susceptible d'avoir réagi avec le composé cible, et redisperser les nanoparticules récupérées dans une solution de référence,
- 5 d) disposer la solution obtenue à l'étape c) en un point d'un canal et mesurer le temps que met la solution pour atteindre, par remplissage capillaire, un autre point donné du canal,
- e) comparer le temps mesuré avec un temps de référence, pour conclure
- 10 à la présence ou à l'absence du composé cible.

La détection des composés cibles en solution se fait en utilisant les interactions existant entre la surface interne du canal et le liquide contenant une suspension de particules fonctionnalisées avec un composé, nommé sonde, susceptible de réagir ou de se lier avec le composé cible d'intérêt. La

15 présence d'une réaction sonde-cible modifie la surface des particules et donc son interaction avec la surface interne du canal et, par voie de conséquence, la vitesse de remplissage, par capillarité, du canal. Le procédé selon l'invention utilise donc la microfluidique, qui peut se définir comme l'étude et l'exploitation des écoulements de fluides dans des canaux dont les

20 dimensions sont généralement de l'ordre de quelques dizaines de microns au maximum, dans le sens de la profondeur le plus souvent.

La réaction cible/sonde entraîne une variation de la tension superficielle du liquide en fonction de sa composition, ce qui modifie la vitesse de remplissage, par capillarité, du microcanal. Dans le cadre de l'invention, la

25 mesure du temps de remplissage joue le rôle de capteur de la cible d'intérêt. La comparaison de la vitesse obtenue avec un temps de référence permet de conclure si la cible est présente ou pas. Le temps de référence correspond au temps de remplissage d'un canal identique, obtenu sur un parcours identique, avec une solution de nanoparticules identiques porteuses d'au

30 moins un composé sonde dans la solution de référence. En l'absence de variation, on peut conclure en l'absence du composé cible. Une variation significative, qui dépend de la méthode de mesure (de quelques dixièmes de

seconde à quelques minutes), permet de conclure en la présence du composé cible.

Le procédé de détection selon l'invention présente de nombreux avantages : une très grande simplicité de mise en œuvre, un très bas coût, des volumes très faibles (de l'ordre de quelques microlitres) et une rapidité de mise en œuvre, contrairement notamment aux tests d'immunoagglutination et surtout la possibilité de pouvoir effectuer la mesure sur site (zones difficiles d'accès, pays pauvres, etc...). De plus, par rapport aux méthodes mettant en œuvre une puce ADN ou un test ELISA ou encore un test Western Blot, le procédé selon l'invention ne nécessite pas de marquage avec une sonde fluorescente, comme c'est le cas pour les puces à ADN avec les brins d'ADN contenus dans l'échantillon ou pour les tests ELISA ou Western Blot avec l'anticorps complémentaire de l'antigène contenu dans l'échantillon.

La description qui va suivre, en référence aux Figures annexées, va permettre de mieux comprendre l'invention.

La **Figure 1** illustre différentes étapes pouvant être utilisées pour la réalisation d'un support comportant une pluralité de canaux et qui peut être utilisé pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention

La **Figure 2** représente schématiquement, la géométrie des canaux présents sur le support utilisé à l'exemple 1.

Les **Figures 3, 4, 5, 6 et 7** présentent différentes mesures de temps de remplissage.

En préalable à une description plus détaillée de l'invention, les définitions de certains termes utilisés dans la présente demande de brevet sont données ci-après.

Par "composé cible d'intérêt", on entend tout type de composé, molécule ou entité, naturelle ou synthétique, dont il peut être intéressant de détecter la présence. Il peut, par exemple, s'agir de ligands biologiques. La détection de tels ligands biologiques, peut être, de manière connue, utile notamment dans les domaines du biomédical (diagnostic, suivi thérapeutique, dialyse rénale,...), de l'agroalimentaire, de l'environnement

(analyse de l'eau potable, suivi de ressources en eau,...). Il peut également s'agir de polluants ou d'additifs susceptibles d'être présents dans des hydrocarbures utilisables, en tant que carburants.

Par "ligand biologique", on entend les composés naturels et les composés présentant un intérêt biologique. A titre d'exemples de ligands biologiques, on peut, notamment citer les polynucléotides, les polypeptides, les protéines, notamment les anticorps et les antigènes, les sucres, les vitamines, les hormones, la biotine, la streptavidine. Les ADN, ARN, récepteurs membranaires, acides aminés, urée, glucose, sont quelques exemples plus précis.

Le terme "polynucléotide" signifie un enchaînement d'au moins 2 désoxyribonucléotides ou ribonucléotides comprenant éventuellement au moins un nucléotide modifié, par exemple au moins un nucléotide comportant une base modifiée telle que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée permettant l'hybridation. Ce polynucléotide peut aussi être modifié au niveau de la liaison internucléotidique, au niveau du squelette. A titre d'exemple de polynucléotide, on peut citer les oligonucléotides, les acides nucléiques naturels ou encore obtenus par une technique d'amplification enzymatique, les ADN, ARN ribosomiques, ARN messagers, ARN de transfert.

Par "polypeptide", on entend un enchaînement d'au moins deux acides aminés. Les acides aminés en question peuvent être des acides aminés naturels soit primaires codant pour les protéines, soit non codant pour les protéines, ou encore des acides aminés naturels modifiés tels que des acides aminés, dont certaines des fonctions chimiques sont protégées, ou des acides aminés modifiés par action enzymatique.

Le terme "protéine" inclut les holoprotéines et les hétéroprotéines comme les nucléoprotéines, les lipoprotéines, les phosphoprotéines, les métaloprotéines et les glycoprotéines, les enzymes, les récepteurs, les complexes enzyme/substrat, les glycoprotéines, les anticorps, les antigènes.

Le terme "anticorps" inclut les anticorps polyclonaux ou monoclonaux, les anticorps obtenus par recombinaison génétique et des fragments d'anticorps.

Le terme "antigène" désigne un composé susceptible d'être reconnu par un anticorps dont il a induit la synthèse par une réponse immune.

Par "nanoparticule", on entend une particule de taille nanométrique. Ces nanoparticules peuvent être de n'importe quelle forme. De préférence, les nanoparticules utilisées présentent une plus grande dimension comprise dans la gamme allant de 1 à 1000 nm, de préférence de 100 à 300 nm, dimension mesurée par microscopie à force atomique ou par microscopie électronique à transmission ou à balayage. Les particules de forme sphérique sont, néanmoins, préférées. Les nanoparticules sont porteuses d'au moins un, de préférence de 1 à 1000000 et préférentiellement de 10000 à 1000000, composés sondes qui possèdent au moins une fonction ou site de reconnaissance leur permettant de réagir ou interagir avec le composé cible d'intérêt.

Quelques exemples de couples composés cibles/composés sondes sont donnés ci-après : antigène/anticorps, anticorps/antigène, ADN simple brin/ADN simple brin complémentaire, biotine/streptavidine, récepteur/ligand,...

Par "surface hydrophobe", on entend, par exemple, une surface dont l'angle de contact avec l'eau est typiquement supérieur ou égal à 90° (angle droit). Ces angles de contact sont, par exemple, déterminés en déposant, à l'aide d'une microseringue, une goutte d'eau sur la surface plane en question, puis l'angle de contact est mesuré à partir des dimensions de la goutte, selon une méthode bien connue de l'homme de l'art. (W.Gutowski, Fundamentals of Adhesion, L.H. Lee Ed., Plenum Press, New York, 1991).

De même, par "surface hydrophile", on entend, par exemple, une surface dont l'angle de contact avec l'eau est typiquement inférieur à 90° (angle droit).

Les échantillons susceptibles d'être utilisés dans le cadre de l'invention peuvent être liquides ou solides. Dans le cas d'échantillons solides, une mise

en forme pourra être nécessaire, par broyat par exemple. Il peut s'agir d'échantillons biologiques (tissus, sang, urine, salive, lymphe, etc...), alimentaires, de tout type de prélèvements dans le sol, l'eau, d'échantillons issus de carburants.

- 5 Le procédé selon l'invention prévoit de mettre, préalablement en présence, l'échantillon à étudier susceptible de contenir le composé cible d'intérêt avec une solution contenant des nanoparticules porteuses d'au moins un composé sonde, qui possède au moins une fonction ou site de reconnaissance lui permettant de réagir ou interagir avec le composé cible
- 10 d'intérêt. La nature de la solution contenant les nanoparticules doit permettre l'interaction entre la sonde et la cible.

- La mise en contact ou la mise en présence, par exemple par mélange, de la solution contenant les nanoparticules et de l'échantillon, est réalisée dans des conditions permettant aux composés cibles et aux composés
- 15 sondes de réagir, par liaison covalente, ou de se lier par d'autres types de liaison forte, par exemple du type ionique, polaire, Van der Waals, hydrogène. Notamment, dans le cas de couple ADN sonde/ADN cible ou antigène/anticorps, les conditions d'incubation classiques pourront être utilisées.

- 20 Ensuite, une solution de référence contenant les nanoparticules, susceptibles d'être porteuses de la molécule cible d'intérêt après interaction avec l'échantillon, est déposée dans un canal dans lequel cette solution va se propager spontanément, et le temps de remplissage du canal, ou plus précisément entre deux points du canal, nommé point de départ et point
- 25 d'arrivée, est mesuré. La solution est déposée, par exemple, à l'entrée du canal, et la solution va alors se propager dans ce dernier. Le volume de solution, qui peut représenter, notamment de 0,1 à 1000 μ l, est par exemple déposé avec une micropipette.

- La présence de la cible d'intérêt, qui a réagi avec la sonde présente en
- 30 surface des nanoparticules, influe sur l'état de surface des nanoparticules, et donc sur la vitesse de remplissage du canal dans laquelle est réalisée la mesure. Le temps de remplissage obtenu est comparé à un temps de

référence, ce qui permet de déterminer qualitativement et/ou quantitativement, l'absence ou la présence de la cible, et éventuellement sa concentration dans l'échantillon étudié. Le temps de référence correspond au temps de remplissage d'un canal identique, obtenu sur un parcours
5 identique, avec une solution de nanoparticules identiques porteuses d'au moins un composé sonde dans la solution de référence. La concentration des nanoparticules et la solution dans laquelle elles se trouvent doivent être les mêmes pour la mesure de référence et pour celle concernant le composé d'intérêt, pour que le seul paramètre susceptible de modifier le temps de
10 remplissage soit l'interaction du composé sonde avec le composé cible éventuellement présent. Aussi, une fois que la solution a été mise en contact, pendant un temps suffisant, par exemple entre une minute et deux heures, avec l'échantillon à étudier, les nanoparticules porteuses d'au moins un composé sonde susceptible d'avoir réagi avec le composé cible, sont
15 récupérées et redispersées dans une solution de référence.

Cette récupération peut se faire par filtration ou par toute autre technique adaptée. L'étape de récupération doit offrir la possibilité d'extraire de manière simple et fiable l'ensemble des nanoparticules de la solution de mise en contact. Aussi, tout type de nanoparticules, susceptibles d'être
20 collectées de manière simple et fiable à partir d'une dispersion, convient. Néanmoins, des nanoparticules magnétiques préalablement fonctionnalisées avec un composé sonde spécifique permettant d'interagir directement avec la cible susceptible d'être présente dans l'échantillon, seront de préférence utilisées. De telles particules magnétiques sont, par exemple, constituées
25 d'un cœur en ferrite recouvert d'un polymère. Il est également possible d'utiliser des particules avec un cœur en nickel ou en tout autre matériau susceptible d'interagir avec un champ magnétique, par exemple un aimant. On pourra, par exemple, se référer à « Colloidal Nanoparticles In Biotechnology », Abdelhamid Elaissari, 2008, John Wiley & Sons, INC, pour
30 plus de détails. Leur caractère magnétique permet une séparation aisée du milieu réactionnel, séparation qui peut être réalisée à l'aide d'un aimant. D'une manière générale, on pourra utiliser des nanoparticules à base de tout

type de matériau magnétique ou sensible à toute autre interaction. Le dit matériau sera soit lui-même fonctionnalisable avec le composé sonde, soit recouvert d'un enrobage fonctionnalisable.

De façon avantageuse, un lavage des nanoparticules obtenues après
5 réaction avec l'échantillon d'intérêt est réalisé, pour éviter des interactions non spécifiques et éliminer les molécules ou espèces cibles n'ayant pas réagi, ainsi que toute autre molécule ou espèce présente dans l'échantillon pouvant modifier la tension interfaciale de la solution. Les nanoparticules séparées et lavées sont remises dans une solution de référence, et la mesure du temps
10 de remplissage est alors réalisée. La solution de référence est notamment une solution aqueuse dans le cas où les composés cibles sont hydrophiles et, est, par exemple de l'eau pure. Dans le cas où les composés cibles sont hydrophobes, la solution de référence pourra être un solvant organique tel que l'acétonitrile, l'éthanol, le méthanol, ou tout autre solvant typiquement
15 utilisé en chimie organique.

La mesure du temps de référence peut être réalisée en amont et être enregistrée pour servir de référence pour plusieurs mesures. Il est également possible et préféré de réaliser la mesure de référence, de manière rapprochée dans le temps avec la mesure concernant l'échantillon d'intérêt
20 et/ou de réaliser une mesure de référence pour chaque nouvelle mesure sur un échantillon d'intérêt. Le même canal ou deux canaux différents, mais en tout point identique, pourront être utilisés pour les deux mesures.

Il existe une relation linéaire entre le temps de remplissage du canal et la concentration en molécule cible d'intérêt, de sorte qu'une étape de calcul à
25 partir du temps mesuré permet de déterminer la concentration du composé cible d'intérêt dans l'échantillon et le procédé selon l'invention peut inclure une telle étape de calcul.

Le canal dans lequel la solution est disposée peut être réalisé sur tout type de format de support, notamment sous les formats classiques connus
30 dans le domaine des puces microfluidiques, cartouches d'analyse qui peuvent se présenter sous diverses formes, par exemple carrée, rectangulaire ou circulaire. Ces puces microfluidiques sont constituées d'un support et

éventuellement d'un couvercle, le support étant muni d'un seul ou d'une pluralité de canaux. En effet, le ou les canaux se présente(nt) sous la forme d'un conduit de section fermée. Le couvercle sera alors, par exemple, troué au niveau de l'entrée du canal dans lequel la solution doit être déposée.

- 5 Dans le cas où plusieurs canaux sont présents, ces derniers seront de préférence identiques, de manière à mener, en parallèle, les mesures concernant les échantillons à analyser et l'échantillon de référence la ou les canaux peuvent être également rectiligne(s) ou présenter des zones courbes ou encore de ralentissement correspondant à un élargissement du canal. Un
- 10 point de détection (par exemple un marquage optique ou des électrodes) sera, avantageusement, présent au niveau des points correspondants au début et à la fin du processus de remplissage capillaire.

- Les supports dans lesquels les canaux sont réalisés dans le cadre de l'invention pourront être ceux classiquement utilisés dans le domaine des
- 15 puces microfluidiques, des cartouches d'analyse et des biopuces. Les canaux sont, avantageusement, de taille micrométrique sur l'une au moins de leurs dimensions et, de préférence présentent une profondeur ou une largeur inférieure à 100 μm . Plus précisément, la profondeur des canaux sera comprise entre 0,1 μm et 500 μm , leur largeur sera comprise entre 1 μm et
- 20 10cm et leur longueur sera comprise entre 100 μm et 1m. Les canaux pourront être réalisés par usinage, par gravure, par pressage à chaud, par moulage, par microablation, par injection, ou par lithographie ou par toutes techniques appropriées, par exemple utilisées dans le domaine des semi-conducteurs, du verre, et des matériaux polymères. A titre d'exemple de
- 25 matériau pouvant être utilisé dans le cadre de l'invention, on peut citer le PDMS (polydiméthylsiloxane), le verre, le quartz, le silicium, les polystyrènes, les matériaux plastiques du type polycarbonate ou oléfine (Cyclo-Oléfine-Copolymère). Ces matériaux pourront être modifiés chimiquement ou physiquement, par exemple, sous l'action d'un greffage ou d'un traitement
- 30 plasma, pour modifier les caractéristiques de surface du matériau et obtenir une surface, par exemple, hydrophile.

Afin que les solutions disposées dans les canaux circulent spontanément dans ces derniers, depuis un premier point de référence, jusqu'à atteindre le point donné, choisi comme fin du temps de remplissage, il faut qu'il existe des interactions privilégiées entre la surface interne du canal et la solution déposée. La surface du canal doit être de nature à faciliter la propagation par capillarité de la solution. Le composé d'intérêt peut être de nature hydrophile (par exemple, dans le cas d'un ligand biologique précédemment décrit) ou hydrophobe (par exemple, dans le cas des polluants ou additifs des hydrocarbures susceptibles d'être utilisés en tant que carburants ou des polluants ou additifs des huiles comestibles).

La solution de référence peut être une solution aqueuse, ou hydrophobe. Il est possible d'utiliser une solution de référence hydrophile, avec des composés cibles hydrophiles ou hydrophobes. De même, il est possible d'utiliser une solution de référence hydrophobe, avec des composés cibles hydrophiles ou hydrophobes. L'important est que la solution contenant les nanoparticules porteuses du composé sonde, tout comme la solution susceptible de contenir les nanoparticules porteuses du composé sonde lié au composé cible, pénètre spontanément dans les microcanaux, certes avec des vitesses de remplissage différentes. Aussi, lorsque la solution de référence est hydrophile, le ou les matériaux constitutifs de la partie du support délimitant le canal sont choisis de manière à ce que la surface du canal en contact avec la solution soit, au moins sur une majeure partie, hydrophile. Par majeure partie, on entend au moins 50% de la surface interne du canal sur laquelle circule la solution déposée. La surface du canal en contact avec la solution aqueuse est, au moins sur une majeure partie, en un matériau choisi parmi le PDMS traité pour présenter une surface hydrophile, le verre, etc... Les polymères sélectionnés peuvent être fonctionnalisés, si besoin, de manière à être hydrophiles. Le fond du support sur lequel est aménagé le canal doit être de nature hydrophile, tout comme le couvercle, mais les parois elles peuvent être hydrophobes, comme c'est le cas notamment du support utilisé aux exemples 2 et 3 ci-après. L'important est que la surface du canal soit, en quelque sorte, globalement hydrophile, de manière à avoir

des interactions hydrophiles avec la solution déposée et permettre le remplissage spontané du canal. Dans certains cas, les parois latérales des canaux et les parties du support voisines du canal peuvent être hydrophobes, le canal restant dans sa globalité hydrophile. Comme dans les exemples 2 et 3, il est possible de réaliser les canaux sur un support de la manière suivante :

- traitement d'une lame de verre plane avec une résine photosensible hydrophobe,
- lithographie UV suivie d'un développement, de manière à éliminer la résine au niveau des canaux et obtenir une surface hydrophile de verre, le reste de la surface du support étant hydrophobe, du fait de la présence de la résine.

Ces différentes étapes sont illustrées **Figure 1**. A titre d'exemple de telles résines photosensibles à caractère hydrophobe, on peut citer la résine sèche commercialisée sous la référence Laminar® E9200 par la société Eternal Technology Corporation.

Par contre, lorsque la solution de référence est une solution hydrophobe, notamment huileuse, le ou les matériaux constitutifs de la partie du support délimitant le canal sont choisis de manière à ce que la surface du canal en contact avec la solution est, au moins sur une majeure partie, hydrophobe. Dans ce cas, la surface du canal en contact avec la solution est, au moins sur une majeure partie, en un matériau choisi parmi les polymères et par exemple, le PDMS, ou encore en silicium ou en verre fonctionnalisé pour être hydrophobe (par exemple avec des silanes fluorés). Les polymères sélectionnés peuvent être fonctionnalisés, si besoin, de manière à être hydrophobes.

La mesure du temps de remplissage du canal peut être réalisée de façon extrêmement simple à l'œil, par exemple avec un chronomètre. Bien entendu, pour une mise en œuvre plus performante et fiable, il pourra être fait appel à un dispositif automatique, notamment de mesure d'avancée, mettant en œuvre, par exemple, une caméra et un logiciel approprié. Il est également possible d'utiliser une détection électrique, ou encore une mesure

optiques simple, du type réflexion, absorbance ou fluorescence, grâce à un ou plusieurs capteurs optiques notamment.

La description qui précède met en évidence que le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre sur un système léger, transportable qui
5 nécessite de faibles volumes d'échantillon, telles que des plaques porteuses de canaux de taille micrométrique. De plus, sa mise en œuvre est rapide et ne nécessite pas de marquage préalable de l'échantillon à étudier. De plus, le procédé selon l'invention peut être conduit à température ambiante.

Les nanoparticules fonctionnalisées porteuses de la molécule ou espèce
10 sonde, susceptibles d'interagir avec la molécule ou l'espèce sonde sont stables et pourront être conservées pendant une durée prolongée.

De plus, le procédé selon l'invention offre de nombreuses applications, notamment, applications dans l'analyse biomédicale, l'analyse vétérinaire, le contrôle de microorganismes pathogènes dans l'agroalimentaire et dans
15 l'environnement.

Les exemples, en référence aux Figures annexées, ci-après permettent d'illustrer l'invention mais n'ont aucun caractère limitatif.

Exemple 1

Détection de biotine

20 Les trois liquides (solution 1, solution 2 et solution 3) suivants :

- De l'eau (solution 1)
- De l'eau avec des particules magnétiques modifiées en surface par la streptavidine diluées dans l'eau 20 fois d'une solution initiale à 5mg/ml (solution 2). Ces nanoparticules sont commercialisées par la société
25 ADEMTECH SA (« BioAdemBeads Streptavidin »)
- De l'eau avec la même concentration de nanoparticules magnétiques mais qui ont préalablement interagi avec une solution de biotine à $2,66 \cdot 10^{-3}$ M. (solution 3)

ont été injectés au niveau de l'entrée **E**, (symbolisée par les ronds blancs)
30 dans les trois canaux micro-usinés, présentant une zone de ralentissement **R** (symbolisée par les ronds noirs), tels que représentés schématiquement sur

la **Figure 2** dans une puce en PDMS (« Sylgard 184 ») rendue hydrophile par un traitement plasma O₂.

Les dimensions des canaux sont les suivantes : 35µm de profondeur, 300 µm de largeur, 22,15 cm entre les deux repères d'avancée **D** et **F**, permettant respectivement d'indiquer le début et la fin de la mesure du temps de remplissage.

Un volume total de 2325 nl de chaque solution a été introduit dans un des trois canaux.

Les temps de remplissage suivants ont été obtenus :

10 Temps de remplissage canal 1 (solution 1) : 231,32s±0,81s

Temps de remplissage canal 2 (solution 2) : 270,0s±8,3s

Temps de remplissage canal 3 (solution 3, concentration initiale en biotine : $3,25 \times 10^{-4} \text{M}$) : 300,5s

15 Temps de remplissage canal 3' (solution 3', concentration initiale en biotine : $1,32 \times 10^{-3} \text{M}$) : 312,7s

Ces résultats confirment bien que toute modification au niveau de la surface des nanoparticules magnétiques entraîne une modification de la vitesse d'écoulement dans des microcanaux en PDMS, dans le cas de l'interaction biologique avidine-biotine.

20

Exemple 2

a) Description de la fabrication de la puce.

De la résine bleue photosensible (Etertec HQ-6100, Chimie Tech Service - CTS) est utilisée pour la fabrication des puces. La résine bleue est laminée sur une lame de verre et irradiée pendant 4s en présence d'un masque de photolithographie correspondant à la forme des canaux désirés. Après révélation, des canaux creusés à l'intérieur de la résine sont obtenus (300µm de large, 35µm de profondeur et 4cm de longueur). Après révélation, la lame de verre porteuse des canaux en résine bleue est irradiée de nouveau pendant 2,5 s.

30

Une lamelle de verre est, ensuite, utilisée pour couvrir la lame recouverte avec la résine bleue et ainsi fermer les canaux. La lamelle de

verre est ouverte au niveau de l'entrée du canal. L'ensemble est collé efficacement sous presse chauffante à 90°C, sous une pression de 15 bars pendant 2 min. Le temps d'insolation et les paramètres de collage ont été optimisés.

- 5 Plusieurs barèmes de collage ont été étudiés (temps, température, pression). Les températures testées sont (80, 90 et 100°C), la pression (10, 15 et 20 bars) et le temps (1, 1,5, 2 et 3 min) et les meilleurs paramètres de collage sélectionnés sont : 90°C, 2 min, 15 bars.

- 10 Des tests de remplissage des canaux avec de l'eau ont montré la bonne entrée du liquide à l'intérieur des canaux et, également, validé la possibilité de réutiliser la puce plusieurs fois, ce qui n'est pas possible avec une puce réalisée en PDMS.

b) Détection de la bactérie *E.Coli*

- 15 La détection de la bactérie E. Coli est basée sur une interaction antigène- anticorps. Le protocole suivant a été utilisé:

- 20 -préparation d'une solution de nanoparticules à 5mg /ml (dans du tampon PBS) diluée 40 fois dans l'eau. Ces nanoparticules sont commercialisées par la société ADEMTECH SA (« BioAdemBeads Streptavidin »)

- addition à la solution de nanoparticules 20 µl d'une solution (solution PBS 0,01M, pH 7,2) d'anticorps polyclonaux biotinylés à 1 mg/ml (Anticorps anti-E.coli biotinylé commercialisé par la société ABCAM (ab20640))

- 25 -incubation 1 h à 4°C

- récupération des nanoparticules à l'aide d'un aimant

- lavage 3 fois à l'eau

- suspension des nanoparticules dans des solutions (milieu de culture) de bactéries à 10^2 , 10^3 , 10^4 et 10^5 UFC, nommées respectivement bact 1, bact 2, bact 3 et bact 4 sur la **Figure 6** (Bactérie E.Coli « Collection de l'Institut Pasteur CIP 76.24).

- récupération des nanoparticules avec un aimant

Les résultats obtenus sont présentés **Figures 3, 4, 5 et 6**. La **Figure 3** montre, différentes mesures, du temps de remplissage d'un même canal microfluidique avec de l'eau ultra-pure (deux mesures : eau 1 et eau 2) et met en évidence la bonne répétabilité du temps de remplissage avec une variation ne dépassant pas les 0,44s avec une moyenne de temps de remplissage de 24,47s et un écart type de 0,31s.

La **Figure 4** représente les temps de remplissage d'un canal avec la solution de nanoparticules porteuses d'anticorps polyclonaux biotinylés, en l'absence de réaction avec des bactéries cibles (quatre mesures : eau bille 1, eau bille 2, eau bille 3, eau bille 4). La bonne répétabilité est confirmée avec une variation de 0,81 s, une moyenne de 27,38 s et un écart type de 0,36.

La **Figure 5** compare la moyenne des temps de remplissage obtenus avec de l'eau (moy eau) et la solution aqueuse de nanoparticules (moy billes) et montre une variation significative entre les temps de remplissage obtenus dans chacun des cas, cette variation étant bien supérieure aux variations obtenues (diff billes-eau), dans le cas de plusieurs mesures réalisées avec une solution de nanoparticules (diff billes-billes).

La **Figure 6** présente les mesures de vitesse obtenues dans le cas de la détection de différentes concentrations d'E.Coli et montre que plus la concentration de bactéries augmente, plus le temps de remplissage est important. Il existe une relation linéaire entre le temps de remplissage et le log de la concentration en bactéries, ce qui permet de quantifier le nombre de bactéries présentes dans l'échantillon.

25 **Exemple 3**

Détection de l'ADN du virus HIV

Le virus du sida est détecté par le biais de son ADN. Pour ce faire, de l'ADN biotinylé est utilisé comme ADN sonde et des brins d'ADN complémentaire comme ADN cible. Les séquences des ADN cibles et sondes sont les suivantes :

HIV ADN sonde: *GAGACCATCAATGAGGAAGCTG-biotine*

HIV ADN cible: *ATCCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTCTC*

La préparation des échantillons est faite comme suit :

- préparation d'une solution de nanoparticules magnétiques à 5 mg/ml (dans tampon PBS) diluée 40 fois. Ces nanoparticules sont commercialisées par la société ADEMTECH SA (« BioAdemBeads Streptavidin »)
- 5 -incubation de cette solution avec 20 µl d'une solution (solution tampon PBS 0,01M, pH 7,2) d'ADN sonde à 70,37 nmole/ml pendant 1 h à 4°C
- récupération des nanoparticules et lavage, de manière analogue à l'exemple 2,
- 10 -incubation des nanoparticules fonctionnalisées avec différentes concentrations d'ADN cible (4,09 nmole/ml, 8,19 nmole/ml et 16,38 nmole/ml nommées respectivement ADN cible 1, ADN cible 2 et ADN cible 3 sur la **Figure 7**) (solution tampon PBS 0.01M, pH 7.2)

Les variations engendrées par la fixation de l'ADN sonde (billes ADN biot sur la **Figure 7**) et de l'hybridation de l'ADN cible (ADN cible 1, ADN cible 2 et ADN cible 3 sur la **Figure 7**) ont été observées et les résultats obtenus sont présentés **Figure 7**.

L'analyse des résultats montre que la fixation de l'ADN sur les nanoparticules augmente le temps de remplissage des canaux. Cette variation est d'autant plus importante que la concentration d'ADN cible est importante. La variation est directement proportionnelle à la concentration d'ADN.

REVENDICATIONS

1 - Procédé de détection d'un composé cible d'intérêt dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

- a) disposer d'une solution contenant des nanoparticules porteuses d'au moins un composé sonde, qui possède au moins une fonction ou site de reconnaissance lui permettant de réagir ou interagir avec le composé cible d'intérêt,
- b) mettre en contact la solution contenant des nanoparticules porteuses d'au moins un composé sonde, avec l'échantillon d'intérêt,
- c) récupérer les nanoparticules porteuses d'au moins un composé sonde, susceptible d'avoir réagi avec le composé cible, redisperser les nanoparticules récupérées dans une solution de référence,
- d) disposer la solution obtenue à l'étape c) en un point d'un canal et mesurer le temps que met la solution pour atteindre, par remplissage capillaire, un autre point donné du canal,
- e) comparer le temps mesuré avec un temps de référence, pour conclure à la présence ou à l'absence du composé cible.

2 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la solution de référence est une solution aqueuse et en ce que la surface du canal en contact avec la solution est, au moins sur une majeure partie, hydrophile.

3 - Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que la surface du canal en contact avec la solution est, au moins sur une majeure partie, en un matériau polymère, tel que le PDMS traité pour présenter une surface hydrophile, en verre, ou en un polymère éventuellement fonctionnalisé de manière à être hydrophile.

4 - Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le composé cible est un ligand biologique.

5 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que le ligand biologique est choisi parmi les polynucléotides, les polypeptides, les protéines, notamment les anticorps et les antigènes, les sucres, les vitamines, les hormones, la biotine, la streptavidine.

- 6** - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la solution de référence est une solution hydrophobe, notamment huileuse, et en ce que la surface du canal en contact avec la solution est, au moins sur une majeure partie, hydrophobe.
- 5 **7** - Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que la surface du canal en contact avec la solution est, au moins sur une majeure partie, en un matériau choisi parmi le PDMS, le verre fonctionnalisé de manière à être hydrophobe, ou un polymère éventuellement fonctionnalisé de manière à être hydrophobe.
- 10 **8** - Procédé selon la revendication 6 ou 7 caractérisé en ce que le composé cible est choisi parmi les polluants ou additifs des hydrocarbures susceptibles d'être utilisés en tant que carburants, ou les polluants ou additifs des huiles comestibles.
- 15 **9** - Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le canal est de taille micrométrique sur au moins l'une de ses dimensions.
- 10** - Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que les nanoparticules sont magnétiques.
- 20 **11** - Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que les nanoparticules sont, au moins pour partie, constituées de ferrites ou nickel.
- 12** - Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le temps de référence correspond au temps de remplissage d'un canal identique, obtenu sur un parcours identique, avec une solution de nanoparticules identiques porteuses d'au moins un composé sonde dans la
- 25 solution de référence.
- 13** - Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend une étape de calcul à partir du temps mesuré permettant de déterminer la concentration du composé cible d'intérêt dans l'échantillon.
- 30 **14** - Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la mesure de la vitesse est effectuée au moyen d'un dispositif automatisé, intégrant une caméra ou un capteur optique.

15 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisé en ce que la mesure de la vitesse est effectuée par mesure électrique ou optique.

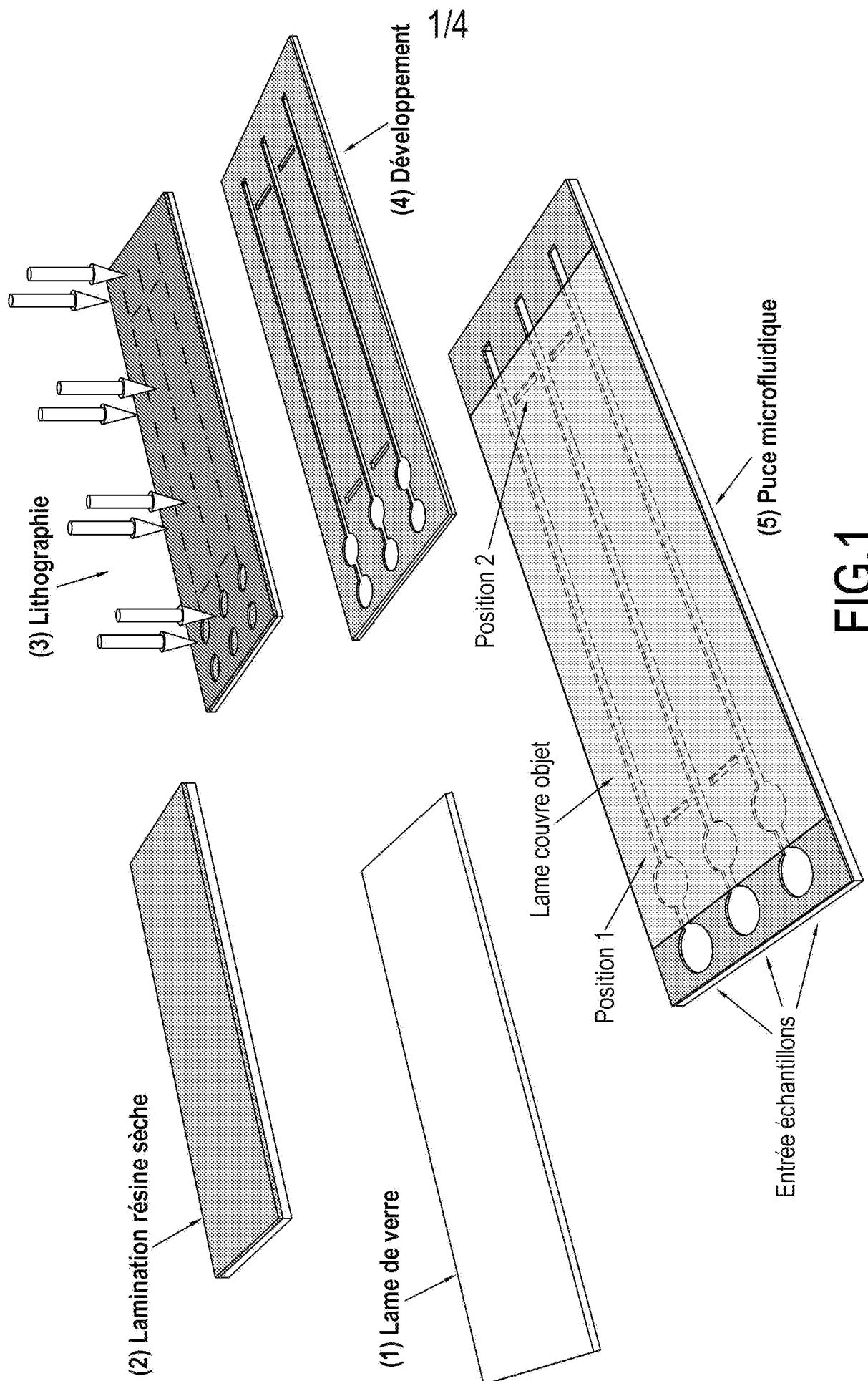


FIG.1

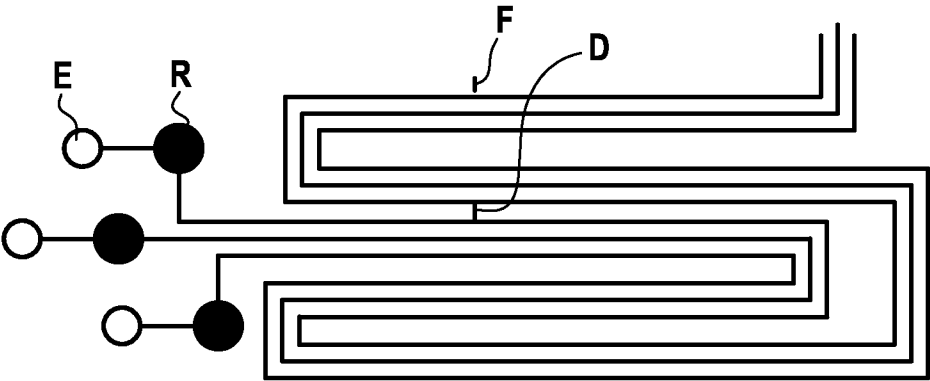


FIG.2

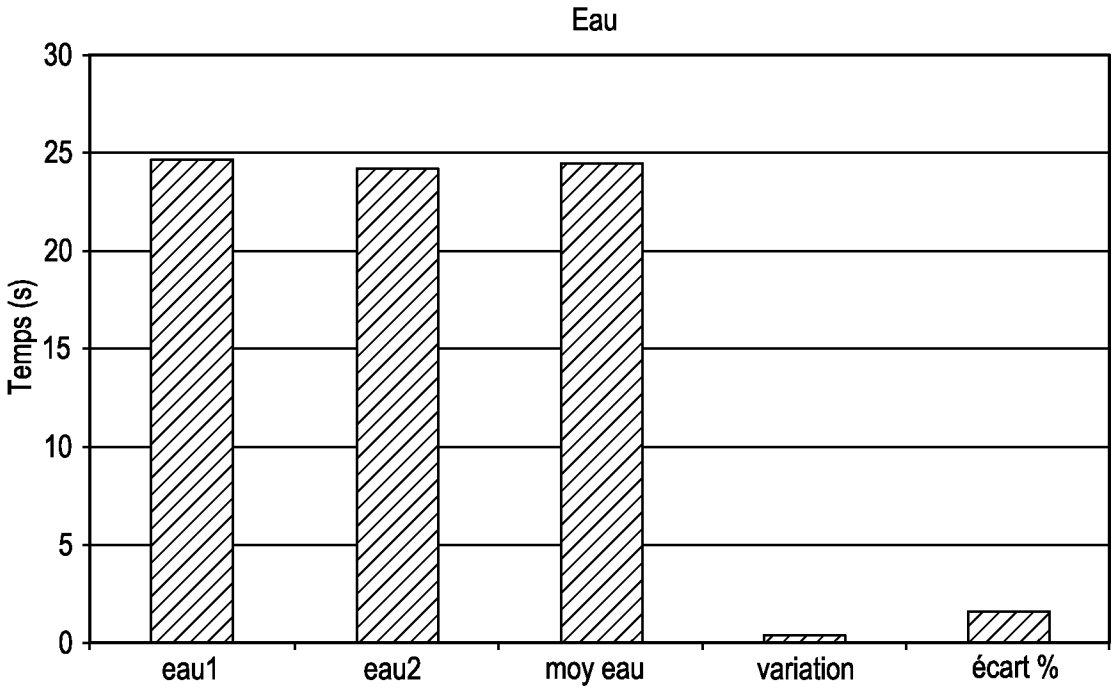


FIG.3

3/4

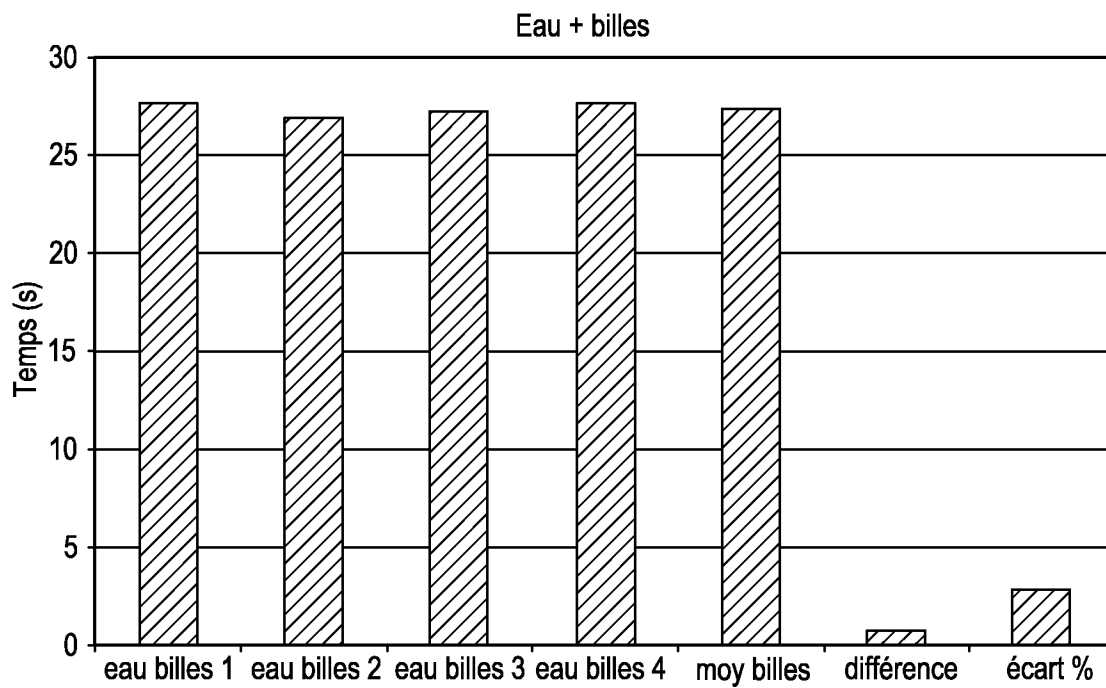


FIG.4

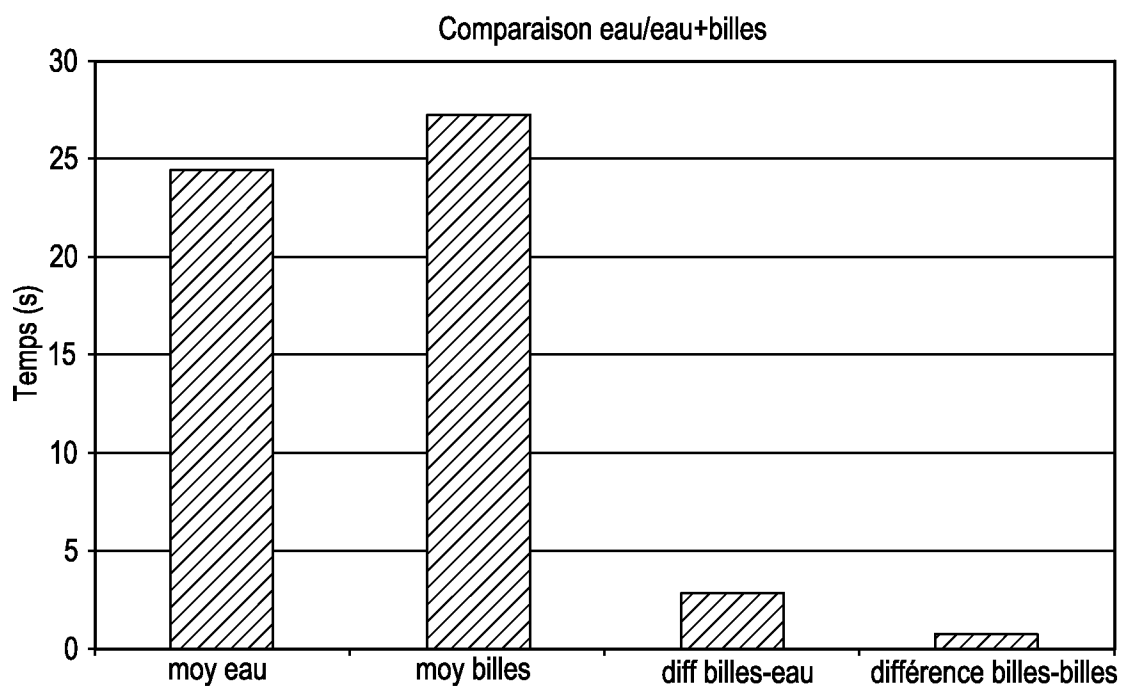


FIG.5

4/4

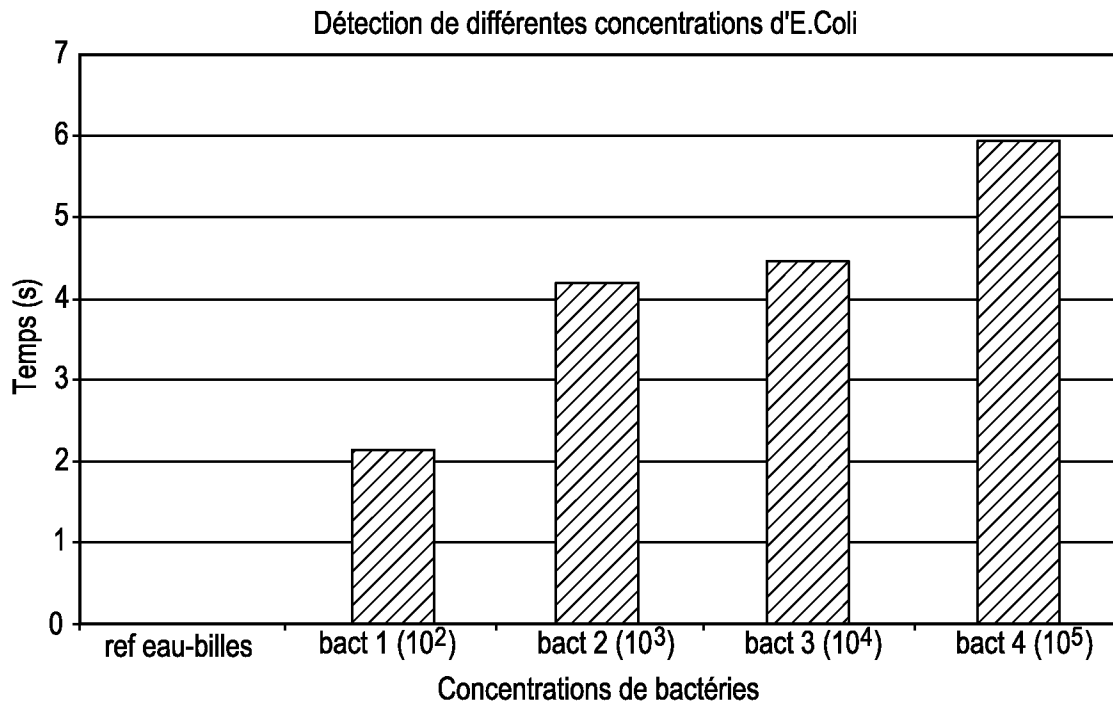


FIG.6

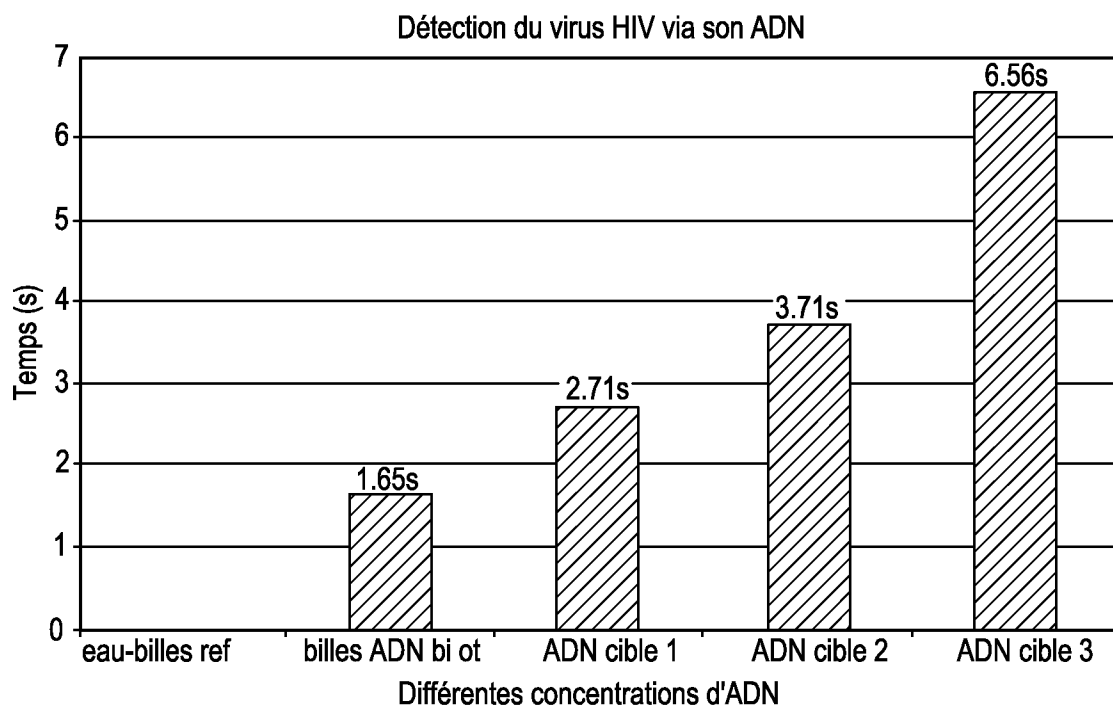


FIG.7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2010/050998

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/543

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

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VARSHNEY ET AL: "A label-free, microfluidics and interdigitated array microelectrode-based impedance biosensor in combination with nanoparticles immunoseparation for detection of Escherichia coli 0157:H7 in food samples" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 128, no. 1, 7 November 2007 (2007-11-07), pages 99-107, XP022335649 ISSN: 0925-4005 * abstract	1-15
A	WO 2006/124340 A2 (CALIFORNIA UNIVERSITY [US]; SOHN LYDIA L [US]; CARBONARIO ANDREA [US];) 23 November 2006 (2006-11-23) the whole document ----- -/--	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 September 2010

Date of mailing of the international search report

16/09/2010

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

Adida, Anne

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2010/050998

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 2002/187071 A1 (LAW WAI TAK [US]) 12 December 2002 (2002-12-12) the whole document -----	1-15
A	US 2009/075393 A1 (LOPEZ GABRIEL [US] ET AL) 19 March 2009 (2009-03-19) the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2010/050998

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006124340 A2	23-11-2006	CA 2607579 A1 EP 1888790 A2	23-11-2006 20-02-2008
US 2002187071 A1	12-12-2002	NONE	
US 2009075393 A1	19-03-2009	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2010/050998

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. GOIN33/543

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)

GOIN

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, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, 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
A	VARSHNEY ET AL: "A label-free, microfluidics and interdigitated array microelectrode-based impedance biosensor in combination with nanoparticles immunoseparation for detection of Escherichia coli 0157:H7 in food samples" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 128, no. 1, 7 novembre 2007 (2007-11-07), pages 99-107, XP022335649 ISSN: 0925-4005 * abrégé	1-15
A	WO 2006/124340 A2 (CALIFORNIA UNIVERSITY [US]; SOHN LYDIA L [US]; CARBONARIO ANDREA [US];) 23 novembre 2006 (2006-11-23) le document en entier	1-15
	----- -/--	



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



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

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

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

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

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 septembre 2010

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/09/2010

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

Adida, Anne

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2010/050998

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 2002/187071 A1 (LAW WAI TAK [US]) 12 décembre 2002 (2002-12-12) le document en entier -----	1-15
A	US 2009/075393 A1 (LOPEZ GABRIEL [US] ET AL) 19 mars 2009 (2009-03-19) le document en entier -----	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2010/050998

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2006124340 A2	23-11-2006	CA 2607579 A1 EP 1888790 A2	23-11-2006 20-02-2008
US 2002187071 A1	12-12-2002	AUCUN	
US 2009075393 A1	19-03-2009	AUCUN	