

(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 mars 2006 (02.03.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/021716 A1

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/543 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/050629

(22) Date de dépôt international : 29 juillet 2005 (29.07.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0451747 30 juillet 2004 (30.07.2004) FR

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75794 PARIS cedex 16 (FR). **UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE** [FR/FR]; 58 Boulevard Charles Livon, F-13284 MARSEILLE Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **THIBAUDAU, Franck, Alain, Claude** [FR/FR]; 83 Boulevard du Redon, La Rouvière E4, F-13009 MARSEILLE (FR). **CHARRIER, Anne** [FR/FR]; 23 rue du Capitaine Dessemond, F-13007 MARSEILLE (FR).

(74) Mandataires : **CATHERINE, Alain** etc.; Cabinet Harle & Phelip, 7, rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale*
— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*
— *avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: DEVICE FOR DETECTING THE BINDING OF A TARGET COMPOUND TO A BAIT COMPOUND WHICH IS IMMOBILISED ON A SUPPORT AND DETECTION METHOD

(54) Titre : DISPOSITIF POUR DETECTER LA FIXATION D'UN COMPOSE CIBLE SUR UN COMPOSE APPAT IMMOBILISE SUR UN SUPPORT ET PROCEDE DE DETECTION

(57) Abstract: The invention relates to a device for detecting the binding of a target compound to a bait compound which is immobilised on a support. The inventive device comprises: a) a solid support; b) a coating which is linked non-covalently to the surface of the solid support; and c) a plurality of microparticles or nanoparticles which are linked to the coating, whereby at least one bait compound is fixed to each of same.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet un dispositif pour détecter la fixation d'un composé cible sur un composé appât immobilisé sur un support, ledit dispositif comprenant : a) un support solide ; b) un revêtement lié de manière non covalente à la surface dudit support solide ; et c) une pluralité de microparticules ou de nanoparticules sur chacune desquelles est fixé au moins un composé appât, lesdites microparticules ou nanoparticules étant liées au revêtement.



WO 2006/021716 A1

Dispositif pour détecter la fixation d'un composé cible sur un composé appât immobilisé sur un support et procédé de détection

5 DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte à un dispositif et à un procédé pour détecter la fixation d'un composé cible sur un composé appât, ledit composé appât étant immobilisé sur un support.

Le dispositif et le procédé de détection selon l'invention peuvent être
10 utilisés dans l'industrie pour des objectifs variés, par exemple pour tester la présence de composés cibles d'intérêt, tels que des antigènes, des anticorps, des protéines cellulaires, des peptides, des principes actifs de médicaments, des acides nucléiques ou toute autre molécule ligand.

Le dispositif et le procédé selon l'invention sont utilisés notamment
15 pour la détection de la présence d'un acide nucléique cible dans un échantillon.

ETAT DE LA TECHNIQUE

Il existe un besoin dans l'état de la technique pour de nouveaux dispositifs et de nouveaux procédés susceptibles de permettre une
20 détection améliorée de la fixation de molécules cibles sur des molécules appâts, telles que des molécules appâts constituées par des acides nucléiques, des protéines réceptrices, notamment des anticorps.

On connaît les dispositifs de détection d'une pluralité de composés cibles, telles que les « puces à ADN » ou les « puces à protéines », et les
25 procédés de détection qui les mettent en œuvre.

Ces puces consistent en un substrat sur la surface duquel est immobilisée une pluralité de composés appâts distincts, chaque composé appât étant localisé en une position déterminée sur la surface du substrat, distincte de la localisation des autres composé appâts. En général, les
30 différents composés appâts sont distribués spatialement sur le substrat, sous la forme d'une matrice à deux dimensions, chaque case de la matrice correspondant à un composé appât. Pour détecter une pluralité de composés cibles dans un échantillon susceptible de les contenir, la puce

est d'abord mise en contact avec l'échantillon, dans des conditions d'environnement permettant la formation d'un complexe entre les composés cibles et les composés appâts immobilisés à la surface du substrat. Dans une deuxième étape, la formation des complexes formés à la surface de la

5 puce est détectée et localisée par diverses techniques. La pluralité des positions où cette formation a été détectée permet alors de détecter de manière qualitative, voire de manière quantitative, la présence d'une pluralité de composés cibles.

D'autres dispositifs comprennent une pluralité de microparticules

10 appâts. Les microparticules appâts forment, dans certaines conditions d'environnement, des complexes avec les composés cibles. Une microparticule appât a des caractéristiques qui permettent d'identifier la cible avec laquelle elle est susceptible de former un complexe. Dans un premier temps, on disperse le dispositif avec un échantillon contenant des

15 composés cibles, dans des conditions permettant la formation des complexes. Dans un deuxième temps, on détecte les particules ayant formé des complexes à leur surface avec les composés cibles, et on détermine simultanément les caractéristiques, par exemple les caractéristiques de fluorescence de ces microparticules. En général, les caractéristiques

20 d'identification des particules sont obtenues par l'incorporation d'un fluorochrome dans la masse des microparticules et/ou sur les composés cibles contenus dans l'échantillon. La détection des complexes est réalisée à l'aide d'un détecteur de fluorescence, par exemple un détecteur de fluorescence inclus dans un dispositif de détection du type cytomètre de

25 flux. Ce type de technique est décrite, par exemple, dans les brevets américains n° US 6,599,331 et n° US 6,649,414.

On a également décrit des dispositifs de détection comprenant une pluralité de couches de particules d'oxyde métallique, une partie au moins des particules étant liées par des liaisons chimiques covalentes à la surface

30 d'un support. Des récepteurs ou des ligands sont fixés à la surface des particules en vue de détecter la fixation éventuelle d'un ligand ou récepteur

correspondant susceptible d'être présent dans un échantillon à tester, par des techniques de détection conventionnelles, comme dans la demande PCT n° WO 00/33078.

On connaît aussi des dispositifs de détection comprenant un support solide sur lequel sont immobilisées, au moyen d'une fixation non covalente sur une couche intermédiaire, des particules comprenant des composés, tels que des acides nucléiques, capables de se lier à des analytes, tels que des acides nucléiques de séquence complémentaire, comme dans la demande de brevet américain n° US 2003/0017464. Dans ce type de dispositif, la couche intermédiaire sur laquelle sont fixées les particules est liée par des liaisons chimiques covalentes au support solide de base. Les analytes, par exemple les acides nucléiques, éventuellement présents dans l'échantillon à tester, sont détectés selon des techniques conventionnelles.

On connaît aussi des dispositifs de détection comprenant des particules de détection qui peuvent être préparés par un procédé comprenant la fixation d'une couche de particules de détection dispersées dans un liant polymère. Un tel procédé peut comprendre une étape de traitement d'un support solide plan par plasma ou oxydation chimique, afin de fonctionnaliser le support avant le dépôt et la fixation des particules de détection en dispersion dans le liant polymère, comme dans la demande PCT n° WO 03/004993. Dans ce type de dispositif, les particules peuvent, dans certains cas, être séparées du support solide par une couche d'adhésion au support, de nature indéfinie, et selon un procédé d'application qui n'est pas précisé.

Il existe toujours un besoin d'améliorer les dispositifs de détection du type « puce à ADN » ou « puce à protéines », de manière à permettre la simplification de leur mise en œuvre dans des procédés de détection ou de criblage, à accroître la rapidité ainsi que le nombre d'échantillons traités simultanément dans de tels procédés de détection, et notamment d'en réduire le coût.

Pour réaliser l'étape de détection de la fixation d'une molécule ou composé cible sur une puce à ADN ou sur une puce à protéines, on a classiquement recours à des techniques de détection par fluorescence, par marquage radioactif ou par révélation d'une activité enzymatique. Le plus souvent, on procède à un marquage préalable des composés contenus dans l'échantillon à tester par des molécules fluorescentes, puis on détecte, par mesure d'un signal de fluorescence, les molécules qui se sont fixées sur les composés appâts immobilisés à la surface de la puce à ADN ou de la puce à protéines. En général, la localisation des signaux de fluorescence à la surface de la puce à ADN, ou de la puce à protéines, est détectée par le capteur d'une caméra CCD ou encore par le capteur d'un microscope à balayage confocal.

Cependant, la détection des molécules ou composés cibles fixés sur les composés appâts immobilisés sur une puce à ADN ou sur une puce à protéines ne possède pas la sensibilité qui serait requise lorsque l'échantillon à tester comprend de très faibles quantités du ou des composé(s) cible(s), par exemple inférieures à 10^6 molécules. On connaît des techniques de détection autres la fluorescence, comme la spectrométrie de masse, la chemiluminescence ou encore la détection directe d'une modification dans la charge électrique du support sur lequel sont immobilisées les molécules appâts. Toutefois, de telles techniques sont longues et complexes à mettre en œuvre..

De plus, des techniques de détection ayant recours à la spectrométrie de masse requièrent l'utilisation de dispositifs de spectrométrie de masse très coûteux.

Afin d'améliorer les conditions de détection de la fixation de molécules ou composés cibles sur la surface d'une puce à ADN, il a été proposé d'utiliser des acides nucléiques cibles fixés sur des nanoparticules d'or colloïdal. L'hybridation des acides nucléiques cibles sur les acides nucléiques appâts correspondants, les acides nucléiques cibles étant préalablement immobilisés sur la puce à ADN, est alors réalisée par une détection optique des particules d'or colloïdal auxquelles sont liés les acides nucléiques cibles, sur la surface du support de la puce à ADN (Fritzsche et al., 2002, Biomedical Nanotechnology Architecture and

Applications, Darryl J. Bornhop, et al., Editors, Proceedings of SPIE , Vol. 4626 : 17-22).

5 Selon cette dernière technique, un signal optique d'une grande intensité est obtenu par réflexion d'un faisceau d'émission de lumière par les particules d'or colloïdal sur lesquelles sont fixés les acides nucléiques cibles ayant hybridé avec les acides nucléiques appâts fixés sur le support de la puce à ADN. Un renforcement de l'intensité du signal de réflexion optique peut être obtenu en revêtant les nanoparticules d'or colloïdal par une couche à base d'argent.

10 Bien que cette technique permette la détection de la fixation d'acides nucléiques cibles sur la puce à ADN avec une grande sensibilité, elle nécessite une étape préalable de marquage, par fixation sur l'or colloïdal, des acides nucléiques cibles contenus dans l'échantillon à tester. Cette préparation préalable, par marquage à l'or colloïdal, des acides nucléiques de l'échantillon à tester rend cette technique lourde à mettre en œuvre.

15 En conséquence, il existe un besoin pour améliorer encore les techniques de détection de la fixation d'un composé ou molécule cible sur un composé ou molécule appât préalablement immobilisé sur un support. En particulier, il serait souhaitable de disposer de techniques de détection plus simples que celles qui sont actuellement connues.

RESUME DE L'INVENTION.

25 La présente invention a pour objet un dispositif pour détecter la fixation d'un composé cible sur un composé appât immobilisé sur un support, ledit dispositif comprenant :

- a) un support solide ;
- b) un revêtement lié de manière non covalente à la surface dudit support solide ; et
- 30 c) une pluralité de microparticules ou de nanoparticules sur chacune desquelles est fixé au moins un composé appât, lesdites microparticules ou nanoparticules étant liées au revêtement.

Selon un mode de réalisation préféré, le revêtement est une couche moléculaire de phospholipides et le ou les composé (s) appât(s) est (sont) un (des) acide(s) nucléique(s).

La présente invention est également relative à un procédé pour détecter la fixation d'un composé cible sur un composé appât, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mettre en contact un échantillon susceptible de contenir ledit composé cible avec un dispositif de détection tel que défini ci-dessus, ledit dispositif comprenant au moins un composé appât se fixant sur ledit composé cible;
- b) détecter les complexes éventuellement formés entre ledit composé cible et ledit composé appât.

DESCRIPTION DES FIGURES

La figure 1 illustre un premier schéma du dispositif de détection selon l'invention.

La figure 1A illustre un schéma du dispositif selon l'invention avant le test. Sur la figure 1A, les microparticules ou les nanoparticules (1) sur lesquelles sont fixés les composés appâts (2) sont adsorbées à la surface d'une couche de phospholipides (3). La couche de phospholipide est elle-même adsorbée à la surface d'un support solide (4).

Sur la figure 1B, le dispositif de l'invention est placé dans des conditions appropriées pour la désorption des microparticules ou des nanoparticules.. En l'absence de formation de complexes entre les composés appâts (2) et des composés cibles, les particules sont désorbées du support solide (4). Les phospholipides sont aussi désorbés du support solide.

La figure 2 illustre un second schéma du dispositif de détection selon l'invention.

La figure 2A est identique à la figure 1A.

Sur la figure 2B, le dispositif de l'invention est placé dans des conditions appropriées pour la désorption des microparticules ou des nanoparticules.. En l'absence de formation de complexes entre les composés appâts (2) et des composés cibles, les particules sont désorbées du support solide (4). Les phospholipides ne sont pas désorbés du support solide.

La figure 3 illustre la désorption de nanoparticules à partir d'un support solide constitué de microbilles de 2 mm de diamètre.

En abscisse : la quantité finale de l'acide nucléique cible dans l'échantillon testé ; En ordonnées : la valeur d'absorbance à la longueur d'onde de 527 nanomètres de la solution de désorption, exprimée en unités arbitraires.

La figure 4 illustre la désorption de nanoparticules à partir d'un support solide constitué d'une cuve de spectrophotométrie en polystyrène, avec trois acides nucléiques cibles distincts, respectivement (i) [] un acide nucléique cible formant un complexe d'hybridation sans mésappariement avec les acides nucléiques appâts, (ii) [▲] un acide nucléique cible formant un complexe d'hybridation provoquant un mésappariement avec les acides nucléiques appâts et (iii) [*] un acide nucléique cible formant un complexe d'hybridation provoquant trois mésappariements avec les acides nucléiques appâts.

En abscisse : la température de test, exprimée en degrés Celsius ; En ordonnées, la valeur d'absorbance à la longueur d'ondes de 527 nanomètres de la solution de désorption, exprimée en unités d'Absorbance.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

De manière surprenante, le demandeur a montré selon l'invention que la fixation d'un composé ou molécule cible sur des microparticules ou des nanoparticules comprenant le composé appât correspondant, les particules étant adsorbées sur un revêtement lié de manière non covalente à un support solide, provoquait une stabilisation des microparticules ou nanoparticules sur la surface du substrat solide.

Notamment, on a montré selon l'invention qu'il était possible de fixer sélectivement un composé cible contenu dans un échantillon à tester, tel qu'un acide nucléique cible, sur un composé appât, tel qu'un acide nucléique appât complémentaire de l'acide nucléique cible, ledit composé appât étant préalablement immobilisé dans un système comprenant un support solide (4) sur lequel on a lié, de manière non covalente, un revêtement (3), notamment une couche de phospholipides (3), le composé appât (2) étant immobilisé sur des microparticules ou des nanoparticules (1) qui sont adsorbées à la surface dudit revêtement (3), par exemple à la surface de la couche de phospholipides (3).

De manière surprenante, on a montré selon l'invention que lorsqu'une proportion, même minimale, des microparticules ou des

nanoparticules, qui comprennent un composé appât, est liée à un composé cible, on constate une stabilisation sur le support solide (4) des microparticules ou des nanoparticules (1) ayant fixé le composé cible.

De plus, on constate qu'un nombre croissant de microparticules ou
5 de nanoparticules comprenant un composé appât est stabilisé sur le support solide lorsque se forment un nombre croissant de complexes entre les composés appâts du dispositif et les composés cibles contenus dans un échantillon à tester.

A l'inverse, on a montré selon l'invention que lorsque, dans le même
10 système placé dans des conditions d'environnement appropriées, il n'y a pas formation de complexes entre les composés appâts du dispositif et les composés cibles de l'échantillon, alors les microparticules ou nanoparticules sont désorbées en quasi totalité du support solide. Dans certains cas, la désorption des microparticules ou des nanoparticules à
15 partir du support solide entraîne aussi, au moins partiellement, la désorption du revêtement qui est lié de manière non covalente sur le support solide. Dans d'autres cas, la désorption des microparticules ou des nanoparticules à partir du support solide n'entraîne pas la désorption de la couche de revêtement.

Enfin, on a montré selon l'invention que la stabilisation des
20 microparticules ou des nanoparticules sur le support solide était accrue lorsque le composé cible se liait simultanément à deux composés appâts fixés respectivement sur deux microparticules ou nanoparticules distinctes du dispositif et provoquait ainsi des liaisons croisées entre ces deux
25 microparticules ou nanoparticules.

Ces résultats particulièrement surprenants ont permis au demandeur de mettre au point un dispositif pour détecter la fixation d'un composé cible, tel qu'un acide nucléique cible, sur un composé appât, tel qu'un acide nucléique appât, s'hybridant avec ledit acide nucléique cible.

L'invention a pour objet un dispositif pour détecter la fixation d'un
30 composé cible sur un composé appât immobilisé sur un support, ledit dispositif comprenant :

- a) un support solide ;
- b) un revêtement lié de manière non covalente à la surface dudit support
35 solide ; et

c) une pluralité de microparticules ou de nanoparticules sur chacune desquelles est fixé au moins un composé appât, lesdites microparticules ou nanoparticules étant liées audit revêtement.

Dans le dispositif ci-dessus, la totalité des microparticules ou des nanoparticules sur lesquelles sont fixés les composés appâts sont en contact direct avec la surface dudit revêtement. Ainsi, dans le dispositif de détection ci-dessus, la pluralité de microparticules ou de nanoparticules forment une couche unique de particules qui est directement en contact avec ledit revêtement.

De manière tout à fait préférée, les microparticules ou les nanoparticules sont liées audit revêtement de manière non covalente. Ainsi, dans le mode de réalisation préférentiel du dispositif ci-dessus, les microparticules ou les nanoparticules sont liées audit revêtement exclusivement par des liaisons faibles non covalentes, y compris des liaisons électrostatiques, des liaisons hydrogène, des interactions hydrophiles/hydrophobes ou des liaisons de Van der Waals.

Ainsi, de manière tout à fait préférée, les microparticules ou les nanoparticules sont simplement adsorbées audit revêtement, sans création de liaisons chimiques covalentes entre ces dernières et ledit revêtement.

Préférentiellement, les microparticules ou les nanoparticules sont simplement adsorbées à la surface du revêtement. Lors de la fabrication d'un dispositif de détection conforme à l'invention, on applique en général une solution aqueuse comprenant lesdites microparticules ou lesdites nanoparticules. Ainsi, dans le dispositif de détection selon l'invention, les microparticules ou les nanoparticules ne sont pas incluses ou dispersées dans une couche d'un quelconque matériau d'inclusion ou de liant, comme par exemple un liant polymère.

Grâce au dispositif de détection ci-dessus, la fixation d'un ou plusieurs composés ou molécules cibles sur le ou les composé(s) appât(s) immobilisé(s) dans ce dispositif peut être visualisée avec une grande sensibilité, du fait de la modification des caractéristiques physico-chimiques du support solide de base provoqué par l'événement de désorption des microparticules ou nanoparticules de la surface dudit support solide de base, en l'absence de formation de complexes entre les composés appâts et les composés cibles.

La désorption des microparticules ou nanoparticules provoque une très grande variation de masse du support solide et en conséquence une grande variation des diverses caractéristiques physico-chimiques du support solide de base.

5 En effet, la désorption des microparticules ou nanoparticules entraîne une modification importante de certaines caractéristiques physico-chimiques du support solide de base ou du dispositif, telles que :

- la couleur et, le cas échéant, les propriétés de fluorescence de la surface du dispositif ;
- 10 - les propriétés de réflexion d'un faisceau d'énergie lumineuse sur la surface du dispositif ;
- les caractéristiques électriques de résistivité et/ou de conductivité et/ou d'impédance du support solide de base, par exemple dans les modes de réalisation du dispositif dans lesquels le support solide de
- 15 base consiste en un canal d'un transistor de type à effet de champ (FET pour « Field Effect Transistor »).
- les caractéristiques de transmission d'une onde sonore traversant le matériau du support solide de base ou se propageant à la surface de celui-ci
- 20 - le potentiel Zeta de la surface du dispositif ;
- les caractéristiques d'électromigration du dispositif

Les caractéristiques spécifiques du dispositif de détection de l'invention permettent son utilisation dans des procédés de détection qui ne comprennent aucune étape préalable de marquage des composés cibles.

25 De plus, le dispositif de détection de l'invention peut être utilisé dans des procédés comprenant une étape de détection simple et directe de la formation de complexes composé appât/composé cible, du fait du changement des caractéristiques de la surface du support solide et des caractéristiques de la solution dans laquelle le dispositif est immergé. Il

30 s'agit d'un avantage technique important, par rapport aux procédés connus n'incluant pas d'étape préalable de marquage des composés cibles, tels que les procédés comprenant une étape de détection des complexes composés appâts/composés cibles non marqués par spectrométrie de masse.

De plus, après désorption des microparticules ou nanoparticules, celles-ci sont libérées du support solide de base et sont en suspension dans la solution dans laquelle est immergé le dispositif de détection, lors de sa mise en œuvre dans un procédé de détection. Ainsi, avec un
5 dispositif de détection conforme à l'invention, la désorption des microparticules ou nanoparticules peut être aussi détectée par la mesure du changement des caractéristiques physico-chimiques de la solution dans laquelle est immergé le dispositif. Par exemple, la détection peut être
10 détectée par une mesure de colorimétrie ou de turbidimétrie de la solution dans laquelle est immergé le dispositif de détection.

Ainsi, on a montré dans les exemples qu'avec un dispositif selon l'invention, la fixation d'une ou plusieurs molécules ou composés cibles sur moins de 10% du nombre des molécules ou composés appâts fixés sur les
15 microparticules ou les nanoparticules adsorbées sur le revêtement provoquait la stabilisation de la quasi totalité des microparticules ou nanoparticules, sur le support solide, ce qui permet la mise en œuvre de procédés de détection avec une très grande sensibilité.

Les divers exemples de la présente demande de brevet décrivent la fabrication d'un dispositif de détection tel que défini ci-dessus comprenant
20 des acides nucléiques appâts liés de manière covalente à des nanoparticules.

On a montré selon l'invention qu'une stabilisation d'un dispositif de détection conforme à l'invention ayant une surface du support de base de 30 mm^2 par blocage de la désorption des microparticules ou
25 nanoparticules, est obtenue par la fixation d'acides nucléiques cibles présents dans l'échantillon liquide à tester à une quantité de 100 femtomoles, voire dans certains cas de 10 femtomoles. Ces résultats montrent la très grande sensibilité d'un procédé de détection réalisé avec le dispositif de détection de l'invention.

30 Comme cela est illustré dans les exemples, un dispositif de détection conforme à l'invention permet la détection jusqu'à plus de 10^9 molécules de composé cible en solution par mm^2 de surface du support solide, ce qui est comparable à ce qui est obtenu avec les technologies classiques de puces à ADN avec marquage préalable des ADN cibles.

On a également montré que le dispositif de l'invention permettait de détecter avec une grande spécificité la fixation du ou des composé(s) cible(s) contenus dans l'échantillon à tester sur le ou les composé(s) appât(s) immobilisé(s) sur le dispositif, puisqu'un échantillon contenant une
5 quantité très élevée, de l'ordre de 1 nanomole, d'un acide nucléique ne s'hybridant pas avec le composé appât immobilisé, ne provoque pas le blocage de la désorption des microparticules ou nanoparticules à partir de la surface du support solide, dans les conditions appropriées.

Ainsi, on a montré selon l'invention que la fixation non spécifique
10 éventuelle de composés autres que les composés cibles, sur le dispositif de détection, n'affecte pas la capacité des microparticules ou nanoparticules à être désorbées de la surface du support solide, dans des conditions appropriées, lorsqu'il n'y a pas d'événement de fixation spécifique de composés cibles sur les composés appâts immobilisés.

15

Le support solide d'un dispositif de détection de l'invention

Tout type de support solide dont les caractéristiques permettent une bonne adhésion du revêtement sur sa surface peut être utilisé dans un dispositif de détection selon l'invention. Le choix d'un support solide
20 particulier en combinaison avec une couche de revêtement déterminée peut être aisément réalisé par l'homme du métier, à l'aide d'essais de routine effectués à la lumière de l'enseignement contenu dans la présente description.

Dans certains modes de réalisation préférés du dispositif de
25 détection ci-dessus, le support solide consiste en un support solide dont au moins la surface au contact avec le revêtement est chargée négativement ou positivement dans une solution aqueuse à pH neutre, par exemple dans une solution tampon conventionnelle tel qu'un tampon phosphate 1 Molaire (1M).

30 Dans certains autres modes de réalisation préférés du dispositif de détection ci-dessus, le support solide consiste en un matériau hydrophobe, en particulier un polymère organique hydrophobe.

De préférence, le support solide est choisi parmi le verre minéral, la silice, le silicium, le mica, une alumine, un quartz, un oxyde métallique et
35 un polymère organique choisi parmi les polymères organiques qui sont

chargés négativement dans une solution aqueuse à pH neutre, par exemple une solution tampon à la concentration 1Molaire.

Comme support à base de mica, on préfère le mica de type muscovite, tel que le mica muscovite commercialisé par la Société
5 METAFIX (Saint-Didier, France).

Comme support solide à base de silice, on préfère les cristaux de quartz revêtus de silice tels que ceux commercialisés par la Société Q-SENSE (Gothenburg, Suède).

Comme support solide de silicium, on préfère une galette de silicium
10 telle que celle commercialisée par la Société AB. Comme autre support solide de silicium, on peut aussi utiliser une galette de nitrure de silicium. Comme support solide en nitrure de silicium, on peut utiliser une galette de silicium dont la surface a été nitrurée sur une épaisseur d'environ 100 nanomètres. Comme support solide en nitrure de silicium, on peut aussi
15 utiliser un support consistant en un capteur d'ions à transistor à effet de champ (appelé en anglais « Ion Sensitive Field Effect Transistor »).

De préférence, l'oxyde métallique du support solide est choisi parmi ZnO, TiO₂, Fe₂O₃ et V₂O₅.

Préférentiellement, le polymère organique du support solide est
20 choisi parmi les polymères suivants : polyéthylène, polypropylène, polybutadiène, polyoxyéthylène, polystyrène, polycarbonate, polyméthacrylate..

Comme polymère organique hydrophobe, on peut utiliser du polystyrène. Comme support solide en polystyrène, on peut utiliser la
25 surface intérieure de cuves de spectrophotométrie en polystyrène.

On peut aussi utiliser un support solide dont la surface en contact avec le revêtement, ou alternativement la totalité de la masse du support solide, est en polystyrène carboxylate.

Comme polystyrène carboxylate, on peut utiliser du polystyrène dont
30 la surface possède des fonctions carboxyles, dont la surface est donc chargée négativement dans une solution aqueuse à pH neutre. Comme support solide en polystyrène carboxylate, on peut notamment utiliser des microbilles de polystyrène carboxylate ayant un diamètre de bille de quelques micromètres, par exemple de 1 µm à 10 µm, en particulier 6 µm.

Le support solide de base englobe tout type de matériau support dont la surface qui est en contact avec le revêtement du dispositif est fonctionnalisée, de manière à conférer à la surface du support une charge nette positive ou négative ou un caractère hydrophobe.

5 Par exemple, le support solide peut consister en un matériau dont la surface en contact avec le revêtement du dispositif a été fonctionnalisée par syllanisation, par implantation ionique ou encore tout autre procédé de fonctionnalisation par traitement physico-chimique de la surface du support.

Pour fabriquer un dispositif de détection selon l'invention, il est
10 avantageux que la surface du support solide qui est en contact avec la couche de revêtement soit chargée positivement ou négativement ou soit hydrophobe. En revanche, il n'est pas nécessaire que la totalité de la masse du support solide soit elle-même chargée ou hydrophobe. Ainsi, pour fabriquer le dispositif de détection selon l'invention, on peut utiliser
15 tout matériau solide possédant des propriétés mécaniques adaptées, dès lors que la surface du support solide qui est destinée à être en contact avec la couche de phospholipides est chargée ou hydrophobe. Selon l'invention, on peut donc utiliser un support solide composite dont le matériau de base qui n'est pas en contact avec le revêtement peut être tout matériau solide
20 ayant des propriétés de résistance mécanique appropriée, y compris un matériau de base en métal, en matière plastique ou en un verre organique. Un tel support composite comprend, au moins sur la surface sur laquelle on adsorbe la couche de revêtement, une couche d'un matériau hydrophobe ou chargé positivement ou négativement dans une solution
25 aqueuse à pH neutre, choisie parmi les matériaux indiqués précédemment. La couche du matériau hydrophobe ou chargé positivement ou négativement peut être appliquée par toute méthode conventionnelle connue de l'homme du métier, en fonction du matériau de base du support solide composite, telle que des techniques de collage, y compris de
30 thermocollage, ou encore de greffage ou de réticulation chimique.

Selon une première caractéristique avantageuse du dispositif de détection selon l'invention, la charge nette de la surface du support solide est de même polarité que la charge nette de la surface des microparticules ou nanoparticules. Ainsi, si la surface du support solide possède une
35 charge nette positive dans une solution permettant au composé cible de

former un complexe avec le composé appât, la surface des microparticules ou des nanoparticules possède aussi une charge nette positive dans la même solution. Inversement, si la surface du support solide possède une charge nette négative dans une solution permettant au composé cible de
5 former un complexe avec le composé appât, alors on préfère que la surface des microparticules ou des nanoparticules possède aussi une charge nette négative dans la même solution.

Selon une caractéristique importante du dispositif de détection selon l'invention, la charge nette du revêtement, qui est lié de manière non
10 covalente au support solide, a préférentiellement une polarité opposée à celle de la surface des microparticules ou des nanoparticules. Ainsi, selon un premier aspect, le revêtement possède une charge nette positive et la surface des microparticules ou nanoparticules possède une charge nette négative, dans une solution permettant au composé cible de former un
15 complexe avec le composé appât. Selon un second aspect, le revêtement possède une charge nette négative et la surface des microparticules ou nanoparticules possède une charge nette positive, dans une solution permettant au composé cible de former un complexe avec le composé appât.

20

Dans certains modes de réalisation du dispositif, la charge nette du revêtement, qui est lié de manière non covalente au support solide, a préférentiellement une polarité opposée à la fois à la surface du support solide et à la surface des microparticules ou des nanoparticules. Ainsi,
25 selon un premier aspect, la surface du support solide possède une charge nette négative, le revêtement possède une charge nette positive et la surface des microparticules ou nanoparticules possède une charge nette négative, dans une solution permettant au composé cible de former un complexe avec le composé appât. Selon un second aspect, la surface du
30 support solide possède une charge nette positive, le revêtement possède une charge nette négative et la surface des microparticules ou nanoparticules possède une charge nette positive, dans une solution permettant au composé cible de former un complexe avec le composé appât.

Ainsi, dans un mode de réalisation préféré du dispositif de l'invention, (i) la surface du support solide en contact avec le revêtement possède une charge nette négative ou positive, (ii) le revêtement possède une charge nette de polarité inverse à la polarité de ladite surface du support solide et
5 (iii) la surface des microparticules ou nanoparticules possède une charge nette de polarité identique à la polarité de ladite surface du support solide, et de polarité inverse au revêtement.

Dans un mode de réalisation particulier du dispositif, le support solide consiste en micro-circuit électronique à base de silicium, ou encore
10 consiste en une partie spécifique de la surface d'un micro-circuit électronique à base de silicium, comme par exemple la grille d'un tel micro-circuit ou encore le canal d'un transistor à effet de champ (FET) compris dans un tel micro-circuit électronique.

En général, le dispositif de détection comprend au moins 100
15 microparticules ou nanoparticules par cm^2 de surface du support solide de base.

Lorsqu'on utilise des nanoparticules, par exemple des nanoparticules d'un diamètre de 15 nm, le dispositif de détection de l'invention peut comprendre jusqu'à au moins $5 \cdot 10^{10}$ nanoparticules par cm^2 .

20 La valeur de surface du support solide de base, qui détermine aussi la surface totale du dispositif de détection, est variable. Notamment, la surface du dispositif de détection de l'invention peut varier de $0,1 \mu\text{m}^2$ à 10cm^2 , selon les cas et selon le type de support solide utilisé.

Selon un premier mode de réalisation, le support solide de base
25 possède une surface plane, comme dans la plupart des supports de matrice d'oligonucléotides ou de protéines qui constituent les puces à ADN ou les puces à protéines. Dans ce mode de réalisation, la surface du support solide de base varie généralement de $0,1 \mu\text{m}^2$ à 10cm^2 , par exemple de 1 à 10cm^2 . Par exemple, dans ce mode de réalisation particulier, la surface
30 du support solide peut être d'environ $0,2 \mu\text{m}^2$, $0,5 \mu\text{m}^2$, $1 \mu\text{m}^2$, $2 \mu\text{m}^2$, $3 \mu\text{m}^2$, $4 \mu\text{m}^2$, $5 \mu\text{m}^2$, $10 \mu\text{m}^2$, $20 \mu\text{m}^2$, $30 \mu\text{m}^2$, $40 \mu\text{m}^2$, $50 \mu\text{m}^2$, $100 \mu\text{m}^2$, $200 \mu\text{m}^2$, $300 \mu\text{m}^2$, $400 \mu\text{m}^2$, $500 \mu\text{m}^2$, $10^3 \mu\text{m}^2$, $5 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$, $10^4 \mu\text{m}^2$, $5 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$, $10^5 \mu\text{m}^2$, $5 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$, 1mm^2 , 2mm^2 , 3mm^2 , 4mm^2 , 5mm^2 , 10mm^2 , 20mm^2 , 30mm^2 , 40mm^2 , 50mm^2 , 1cm^2 , 2cm^2 , 3cm^2 , 4cm^2 , 5cm^2 , 6cm^2 , 7cm^2 , 8cm^2
35 cm^2 ou 9cm^2 . Selon ce premier mode de réalisation, les composés appâts

sont fixés indifféremment sur des microparticules ou sur des nanoparticules, au sens de la présente description.

Selon un autre mode de réalisation particulier, le support solide de base consiste en des microparticules dont la plus grande dimension varie de 500 nanomètres à 2 millimètres. Lorsque les microparticules de support solide sont sphériques, leur diamètre varie préférentiellement de 500 nanomètres à 2 millimètres. Par exemple, la plus grande dimension ou le diamètre des microparticules peut être d'environ 600 nm, 700 nm, 800 nm, 900 nm, 1 μm , 2 μm , 3 μm , 4 μm , 5 μm , 10 μm ; 20 μm , 30 μm , 40 μm , 50 μm , 100 μm , 200 μm , 300 μm , 400 μm , 500 μm ou 1 mm. Selon ce second mode de réalisation, les composés appâts sont fixés exclusivement sur des nanoparticules, au sens de la présente description.

Selon encore un autre mode de réalisation particulier, le support solide de base est de forme sphérique. Il peut être constitué de billes ayant une surface extérieure variant de 0,1 μm^2 à 10 mm^2 . Par exemple, les billes peuvent avoir une surface externe d'environ 0,2 μm^2 , 0,3 μm^2 , 0,4 μm^2 , 0,5 μm^2 , 1 μm^2 , 2 μm^2 , 3 μm^2 , 4 μm^2 , 5 μm^2 , 10 μm^2 , 20 μm^2 , 30 μm^2 , 40 μm^2 , 50 μm^2 , 100 μm^2 , 200 μm^2 , 300 μm^2 , 400 μm^2 , 500 μm^2 , 10³ μm^2 , 5.10³ μm^2 , 10⁴ μm^2 , 5.10⁴ μm^2 , 10⁵ μm^2 , 5.10⁵ μm^2 , 1 mm^2 , 2 mm^2 , 3 mm^2 , 4 mm^2 , 5 mm^2 ou 10 mm^2 .

Le revêtement d'un dispositif de détection de l'invention

Dans un dispositif de détection selon l'invention, le revêtement consiste en une couche (bi-couche) comprenant des molécules amphiphiles, c'est-à-dire des molécules qui présentent une double affinité, à la fois (i) hydrophile et (ii) hydrophobe ou lipophile.

Préférentiellement, le revêtement comprend ou consiste essentiellement en une couche ou une bi-couche de molécules amphiphiles choisies parmi les lipides, en particulier les phospholipides, les agents tensio-actifs ou encore des polymères organiques amphiphiles comme le polyéthylène glycol (PEG).

Parmi les agents tensio-actifs, on préfère les agents tensio-actifs anioniques (charge nette négative) et les agents tensio-actifs cationiques (charge nette positive).

Les agents tensio-actifs anioniques sont les agents tensio-actifs qui se dissocient en un anion amphiphile et un cation, qui est en général un métal alcalin ou un ammonium quaternaire.

Les agents tensio-actifs cationiques sont les agents tensio-actifs qui se dissocient en solution aqueuse en un cation organique et un anion, en général un halogénure.

Les tensioactifs cationiques sont ceux bien connus en soi, tels que les sels d'amines grasses primaires, secondaires ou tertiaires, éventuellement polyoxyalkylénées ; les sels d'ammonium quaternaire tels que les chlorures ou les bromures de tétraalkylammonium, d'alkylamidoalkyl-trialkylammo-nium, de trialkylbenzylammonium, de trialkylhydroxy-alkylammonium ou d'alkylpyridinium ; les dérivés d'imidazoline, le chlorure ou bromure de benzalkonium, le chlorure ou bromure de benzododeciunium, le bromure ou chlorure de cethexonium, le bromure de cétrimonium, le chlorure de cétylpyridinium, le chlorure de dequalinium, le bromure de dodeclonium, le bromure de dodecyl-diméthyl-carboxyméthyl-ammonium, le bromure de tétradonium.

Notamment, les divers agents tensio-actifs anioniques ou cationiques susceptibles d'être mis en œuvre pour préparer le revêtement du dispositif de détection de l'invention englobant ceux qui sont listés dans l'ouvrage « International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook » (8^{ième} Edition, 2000, volume 2, pp :1789-1795, J. Werminger, R. Canterbury, G. McEwen Eds.

Selon un mode de réalisation particulier du dispositif, le revêtement consiste en une couche de phospholipides, la surface de la couche de phospholipides possédant une charge nette en solution à pH neutre qui est soit positive, soit négative.

Préférentiellement, le revêtement possède une charge nette en solution à pH neutre qui est soit positive, soit négative. Pour préparer un revêtement, il n'est pas nécessaire que toutes les molécules comprises dans le revêtement soient elles-mêmes chargées. Ainsi, le revêtement du dispositif peut comprendre un mélange de molécules chargées, soit positivement, soit négativement, avec des molécules non chargées en solution à pH neutre. Dans un mode de réalisation particulier, le revêtement consiste en une couche (bi-couche) de phospholipides, ladite couche (bi-

couche) de phospholipides étant chargée soit positivement, soit négativement, dans une solution tampon à pH neutre.

Préférentiellement, la surface de la couche de phospholipides sur laquelle sont liées les microparticules ou les nanoparticules possède une charge nette positive ou négative dans une solution aqueuse à pH neutre, par exemple une solution aqueuse tamponnant le pH, notamment une solution tampon phosphate à la concentration 1M.

En général, la « couche de phospholipides » consiste en une bi-couche de phospholipides dont les deux faces exposées à l'extérieur possèdent une charge nette positive ou négative dans une solution aqueuse à pH neutre. L'une des faces de la bicouche de phospholipides est maintenue en contact avec la surface du support solide grâce à des liaisons faibles non covalentes, notamment grâce à des liaisons hydrogène, des forces électrostatiques et des liaisons de Van der Waals. La seconde surface extérieure de la bi-couche de phospholipides est exposée au solvant et est au contact avec les microparticules ou les nanoparticules comprenant le ou les composé(s) appât(s) immobilisés.

Toutefois, dans certains modes de réalisation du dispositif de détection selon l'invention, la « couche de phospholipides » peut consister en une monocouche de phospholipides qui adhère de manière non covalente à la surface du support solide, avec la partie hydrophobe des molécules de phospholipides en contact avec la surface du support solide avec la partie hydrophile des molécules de phospholipides qui est en contact avec les microparticules ou les nanoparticules comprenant le ou les composé(s) appât(s) immobilisés. Une « couche de phospholipides » consistant en une monocouche de phospholipides peut être utilisée surtout avec un support solide hydrophobe, comme par exemple le polystyrène.

Par phospholipide chargé positivement, on entend selon l'invention un phospholipide possédant une charge nette positive dans une solution aqueuse à un pH neutre.

Par phospholipide neutre, on entend selon l'invention un phospholipide qui possède une charge nette neutre dans une solution aqueuse à pH neutre.

Par phospholipide chargé négativement, on entend selon l'invention un phospholipide qui possède une charge nette négative dans une solution aqueuse à pH neutre.

Selon l'invention, une solution aqueuse possède un pH neutre
5 lorsque la valeur de mesure du pH de cette solution aqueuse est comprise entre 6,7 et 7,3.

La couche de phospholipides, lorsqu'elle est chargée positivement, comprend de préférence des phospholipides chargés positivement en une quantité d'au moins 1% en poids de la totalité des phospholipides contenus
10 dans ladite couche.

De préférence, les phospholipides chargés positivement sont choisis parmi les phospholipides suivants : 1,2-Dilauroyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine, 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine (EDMPC), 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine, 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine,
15 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine, 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine, et 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine.

Comme autres phospholipides, la couche de phospholipides peut comprendre des phospholipides neutres ainsi que des phospholipides chargés négativement.
20

De préférence, les phospholipides neutres sont choisis parmi le DMPC (1,2-dimyristoyl-P-O-éthylphosphatidyl choline) le DOPC (dioléoylphosphatidyl choline) et le DPPC (dipalmitoylphosphatidyl choline),

De préférence, les phospholipides négatifs sont choisis parmi le
25 DPPG (dipalmytoylphosphatidyl glycérol) , le DMPG (dimyristoylphosphatidyl glycérol), le DPG (diphosphatidyl glycérol ou cardiolipine), le PS (phosphatidylsérine), le PI (phosphatidylinositol), le PG (phosphatidyl glycérol), le DOPS (1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphosérine), le POPS (1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphosérine), le DOPA (acide
30 1,2-dioleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidique), le POPA (l'acide 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidique), le DOPG (1,2-dioleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoglycérol), et le POPG (1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoglycérol),

La couche de phospholipides qui est comprise dans le dispositif
35 selon l'invention peut comprendre un seul type de phospholipide chargé

positivement ou chargés négativement, ou au contraire un mélange de plusieurs types de phospholipides chargés positivement, ou chargés négativement.

Selon un mode de réalisation particulier du dispositif selon l'invention, la couche de phospholipides comprend, en tant que phospholipides, exclusivement des phospholipides chargés positivement, ou exclusivement des phospholipides chargés négativement. Selon ce mode de réalisation, la couche de phospholipides du dispositif comprend 100% en poids de phospholipides chargés positivement, ou 100% en poids de phospholipides chargés négativement, par rapport au poids total de phospholipides de ladite couche.

Dans certains modes de réalisation du revêtement d'un dispositif de détection selon l'invention, la couche de phospholipides peut comprendre un ou plusieurs phospholipides fluorescents. A titre illustratif, on a réalisé un support de détection selon l'invention qui comprenait un support solide constitué de microbilles de polystyrène carboxylate dont la couche de phospholipides comprenait 0,25 pour cent en poids d'un marqueur fluorescent, par rapport au poids total de phospholipides. Comme marqueur fluorescent, on peut utiliser par exemple un cholesteryl fluorescent. Dans ce mode de réalisation, le dispositif de détection comprenait des nanoparticules sur lesquelles étaient immobilisés des acides nucléiques appâts. Par analyse par cytométrie de flux des microbilles du dispositif, avant et après désorption des nanoparticules, on a montré que l'évènement de désorption des nanoparticules provoquait un accroissement du signal d'émission de fluorescence d'un facteur supérieur à 10.

Les microparticules ou les nanoparticules d'un dispositif de détection de l'invention

Lorsque le dispositif de détection selon l'invention comprend des microparticules, ces microparticules sont de forme sphérique, oblongue ou parallélépipédique et leur plus grande dimension varie de 500 nanomètres à 2 millimètres, mieux de 1 μm à 1000 μm , et de manière tout à fait préférée de 1 μm à 500 μm .

Lorsque le dispositif de détection selon l'invention possède des nanoparticules, ces nanoparticules sont de forme sphérique, oblongue ou

parallélépipédique et leur plus grande dimension varie de 3 nanomètres à 100 nanomètres et préférentiellement de 3 à 50 nanomètres. On peut notamment utiliser des nanoparticules de forme sphérique dont le plus grand diamètre varie de 10 nanomètres à 20 nanomètres, le plus grand
5 diamètre pouvant être de 15 nanomètres.

Préférentiellement, les microparticules ou les nanoparticules comprises dans un dispositif de détection selon l'invention ont leur surface extérieure exposée au solvant qui est constituée d'un matériau métallique, d'un matériau semi-conducteur ou d'un matériau isolant.

10 De préférence, la surface extérieure des microparticules ou des nanoparticules possède une charge nette négative dans une solution permettant au composé cible de former un complexe avec le composé appât.

Dans un mode de réalisation particulier du dispositif, la totalité de la
15 masse des microparticules et des nanoparticules est constituée d'un matériau métallique, d'un matériau semi-conducteur ou d'un matériau isolant.

Le matériau métallique des microparticules et des nanoparticules est préférentiellement choisi parmi Au, Ag, Cu et Co.

20 Le matériau semi-conducteur des microparticules ou des nanoparticules est préférentiellement choisi parmi Si, Ge, ZnO, SnO, CdS, CdSe et GaAs.

Le matériau isolant des microparticules ou des nanoparticules est préférentiellement choisi parmi le verre, SiO₂, Fe₂O₃, le latex, ou encore
25 un polymère isolant.

Le ou les composé(s) appât(s) est (sont) lié(s) aux microparticules ou aux nanoparticules par des liaisons non-covalentes ou par des liaisons covalentes.

Ainsi, selon un premier mode de réalisation particulier, le ou les
30 composé(s) appât(s) est (sont) lié(s) aux microparticules ou aux nanoparticules par des liaisons faibles non covalentes, telles que des liaisons hydrogènes, des forces électrostatiques, des liaisons de Van Der Waals. Par exemple, les composés appâts peuvent être simplement adsorbés sur la surface extérieure des microparticules ou des
35 nanoparticules.

Toutefois, selon un mode de réalisation préféré du dispositif de détection de l'invention, les composés appâts sont liés sur les microparticules ou les nanoparticules par des liaisons chimiques covalentes. La fixation des composés appâts de manière covalente à la surface des microparticules ou des nanoparticules peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier, par exemple par fonctionnalisation préalable de la surface des microparticules ou des nanoparticules avant de faire réagir la surface fonctionnalisée des microparticules ou des nanoparticules avec le ou les composés appâts d'intérêt.

Par exemple, la surface des microparticules ou des nanoparticules, notamment de microparticules ou de nanoparticules de verre, peut être fonctionnalisée à l'aide d'agents de silylation. Les agents de silylation sont utilisés largement dans l'état de la technique pour fonctionnaliser les surfaces de matériaux, tels que des surfaces à base de silice. Les agents de silylation monofonctionnels ont été utilisés pour former des monocouches de revêtement de surface fonctionnalisées alors que les agents de silylation bi et tri-fonctionnels ont été utilisés pour former des revêtements polymérisés sur des surfaces de silice.

Plus précisément, les agents de silylation ont été développés pour la silylation de supports solides, tels que des supports de verre qui incluent des groupes fonctionnels qui peuvent être dérivés pour les réactions covalentes ultérieures. Les agents de silylation sont immobilisés sur la surface des supports, tels que du verre, et utilisés afin de préparer des matrices de composés de protéine ou d'oligonucléotide, à haute densité. Par exemple, le N-(3-(triéthoxysilyl)-propyl)-4-hydroxybutyramide (PCR Inc., Gaiensville, Fla. and Gelest, Tullytown, Philadelphie, Etats-Unis d'Amérique) a été utilisé pour la silylation d'un support de verre préalable à la synthèse de matrices d'oligonucléotides par synthèse photochimique, comme cela est décrit par McGall et al. (1997 ; J. Am. Chem. Soc., vol.119 : 5081-5090). De même, des composés hydroxyalkylsilyl ont été utilisés pour préparer des composés hydroxyalkylés, tels que des supports de verre. Le N,N-bis(hydroxyéthyl) aminopropyl-triéthoxysilane a été utilisé pour traiter des supports de verre en vue de permettre la synthèse de matrice d'oligonucléotides à haute densité, comme décrit par MacGall et

al.(1996, Proc. Natl. Acad. Sci., vol.93 : 13555-13560) et par Pease et al. (1994, Proc. Natl. ACAD. SCI., vol.91 : 5022-5026). On a aussi utilisé de l'acétoxypropyltriéthoxysilane pour traiter des supports de verre, comme décrit dans la demande PCT N°WO 97/39151. Egalement, on a utilisé le 3-
5 glycidoxy propyltriméthoxysilane pour traiter des supports de verre afin de fournir un groupe de liaison pour la synthèse d'oligonucléotides, comme décrit dans la demande de brevet européen N°EP 89 120 696.

D'autres techniques également bien connues de l'homme du métier sont utilisées pour immobiliser des protéines, telles que des anticorps, sur
10 la surface de supports appropriés, comme décrit par exemple par Ausubel et al. (2000, Current Protocols in Molecular Biology. SCTN. 22, John Wiley et Duclavier and Sons, Inc.) ou encore par Schena (Ed.) (2000, Microarray Biochip Technology, Eaton Publishing Company/Bio Techniques Books Division) ainsi que dans les brevets US N°6,245,511, N°6,215,894 ;
15 N°6,142,681, N°6,101,946 , N°6,004,755, N°5,930,117, N°5,928,437 et N°5,716,459.

Selon encore un autre mode de réalisation particulier du dispositif de détection selon l'invention, au moins deux composés appâts distincts sont liés à une microparticule ou à une nanoparticule.

20 Comme déjà spécifié précédemment, dans un mode de réalisation particulier du dispositif de détection selon l'invention, le ou les composé(s) appât(s) est (sont) une protéine ou un peptide. Selon ce mode de réalisation particulier du dispositif, le ou les composé(s) appât(s) est (sont) choisi(s) parmi les récepteurs de facteurs de croissance, les récepteurs
25 d'hormones, les récepteurs des neurotransmetteurs, les récepteurs de cytokines, les récepteurs de la matrice extracellulaire, les lectines, les cytokines, les serpinines, les facteurs de transcription, les protéines se liant à l'ADN, les protéines à doigt de zinc, les antigènes de surface cellulaires et les antigènes.

30 A titre illustratif, un composé appât du type facteur de transcription peut être immobilisé sur un dispositif de détection conforme à l'invention par fixation dudit facteur de transcription sur un acide nucléique comprenant une ou plusieurs copies de la séquence nucléique spécifiquement reconnue par ledit facteur de transcription. Dans cet exemple illustratif, l'acide
35 nucléique comprenant la séquence nucléique spécifiquement reconnue par

ledit facteur de transcription est fixé sur les nanoparticules ou aux microparticules comprises dans le dispositif de détection.

Selon encore un autre mode de réalisation particulier du dispositif de détection selon l'invention, le ou les composé(s) appât(s) est (sont) un (des) anticorps. Par « anticorps », on entend selon l'invention aussi bien un anticorps complet qu'un fragment d'anticorps comprenant le domaine CDR d'un anticorps spécifique d'un composé cible. Ainsi, un « anticorps » selon l'invention inclut les fragments Fab, Fab, F(ab')₂, et les fragments d'anticorps à chaîne variable unique (ScFv), dérivés d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, ou encore d'anticorps humanisés, bien connus dans l'état de la technique.

Le dispositif de détection de l'invention est aussi illustré ci-dessous par son mode de réalisation spécifique dans lequel le ou les composé(s) appât(s) est (sont) un (des) acide (s) nucléique (s).

15

Dispositif de détection de l'invention comprenant des composés appâts du type acide nucléique.

Comme cela a déjà été spécifié précédemment dans la présente description, le ou les composé(s) appât(s) peut (peuvent) consister en un (des) acide(s) nucléique(s) appât(s).

Lorsque, dans le dispositif de détection de l'invention, les composés appâts consistent en des acides nucléiques appâts, les composés cibles peuvent être variés. Notamment, ils peuvent consister en des protéines ou des peptides, aussi bien qu'en des acides nucléiques.

Dans tous les cas, l'acide nucléique appât comprend une séquence qui se lie spécifiquement à un composé cible.

Selon un premier mode de réalisation, la séquence de l'acide nucléique qui se lie spécifiquement aux composés cibles peut consister en la séquence d'un « aptamère », par exemple un aptamère préalablement sélectionné grâce à un procédé de type « Selex » bien connu de l'homme du métier. Le procédé Selex consiste en un procédé dans lequel on sélectionne un ou plusieurs acides nucléiques qui se fixent sélectivement sur un composé cible d'intérêt, ce composé cible d'intérêt pouvant être de toute nature, en particulier une protéine ou un peptide d'intérêt. A l'issue du procédé Selex, sont sélectionnés des acides nucléiques qui possèdent une

affinité spécifique pour le composé cible d'intérêt, par exemple la protéine ou le peptide cible d'intérêt.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'acide nucléique appât comprend au moins une séquence s'hybridant avec un acide
5 nucléique cible d'intérêt dans les conditions d'hybridation décrites ci-dessous.

Par conditions d'hybridation, au sens de l'invention, on entend les conditions d'hybridation dans un tampon phosphate comprenant du phosphate à une concentration pouvant varier de 0,01M à 1 M.

10

Selon un premier aspect, un acide nucléique appât comprend exclusivement la séquence se liant spécifiquement aux composés cibles correspondants.

Selon un second aspect, l'acide nucléique appât comprend (i) une
15 séquence qui se lie spécifiquement aux composés cibles et (ii) une séquence qui ne se lie pas aux composés cibles, en particulier dans les conditions d'hybridation décrites ci-dessus.

La séquence (ii) qui ne se lie pas aux composés cibles peut posséder des fonctions variées. En particulier, cette seconde séquence (ii)
20 peut elle-même être composite.

Selon un aspect préféré, la séquence (ii) de l'acide nucléique appât qui ne se lie pas spécifiquement aux composés cibles consiste en une séquence de liaison, ou « linker », qui a pour fonction de séparer physiquement la séquence se liant aux composés cibles de la surface des
25 microparticules ou des nanoparticules sur lesquelles est fixé l'acide nucléique appât, afin d'accroître l'accessibilité de la séquence nucléotidique appât pour les composés cibles.

Selon encore un autre aspect particulier, la séquence (ii) de l'acide nucléique appât qui ne se lie pas spécifiquement aux composés cibles peut
30 être composite et comprendre, respectivement (ii-a) une séquence de liaison de type « linker » dont l'extrémité est liée à (ii-b) une séquence s'hybridant spécifiquement avec une séquence (ii) d'un acide nucléique appât distinct.

Selon encore un autre aspect, deux acides nucléiques appâts
35 distincts contenus dans un dispositif de détection selon l'invention se lient

spécifiquement avec deux parties distinctes du même composé cible. Par exemple, deux acides nucléiques appâts distincts comprennent des séquences (i-1) et (i-2) appâts complémentaires de deux séquences nucléotidiques distinctes, respectivement (Ci-1) et (Ci-2), contenues dans le même ADN ou ARN cible.

Selon encore un autre aspect, un acide nucléique appât comprend une séquence nucléotidique de type sonde d'hybridation grâce à laquelle on peut distinguer, dans les conditions d'hybridation appropriées, deux allèles d'une séquence d'ADN qui se différencient entre eux par la substitution d'une seule base nucléique. Deux allèles se différencient entre eux par la substitution d'une seule base nucléique du fait d'un polymorphisme appelé « polymorphisme simple nucléotidique » (ou SNP pour « Single Nucleotide Polymorphism »).

Pour l'application d'un dispositif de détection de l'invention à la détection de polymorphismes du type SNP, on utilise pour un site polymorphique déterminé, au moins un acide nucléique appât qui s'hybride avec le premier allèle dudit site SNP et qui ne s'hybride pas, dans des conditions d'hybridation identiques, avec le second allèle du site SNP. On peut aussi utiliser un acide nucléique appât qui s'hybride avec le second allèle du site SNP et qui ne s'hybride pas, dans des conditions d'hybridation identiques, avec le premier allèle du site SNP.

De préférence, un tel acide nucléique appât possède, à son extrémité 3', une base qui est complémentaire d'un seul des allèles du site SNP. Ainsi, le dispositif de détection selon l'invention peut être utilisé par la détection de polymorphismes de type SNP dans des acides nucléiques d'ADN génomique.

Dans d'autres modes de réalisation, un dispositif de détection de l'invention comprend, pour un acide nucléique cible donné, au moins deux types d'acides nucléiques appâts distincts, chacun des deux types d'acides nucléiques étant liés à des nanoparticules ou à des microparticules distinctes. Un premier acide nucléique appât s'hybride avec une première région spécifique comprise dans ledit acide nucléique cible. Un second acide nucléique appât s'hybride avec une seconde région spécifique comprise dans ledit acide nucléique cible, distincte de la première région spécifique dudit acide nucléique cible. En général, (i) le premier acide

nucléique appât possède une séquence complémentaire à la première région spécifique de l'acide nucléique cible et (ii) le second acide nucléique appât possède une séquence complémentaire à la seconde région spécifique dudit acide nucléique cible. Selon ce mode de réalisation du dispositif de détection, l'acide nucléique cible, lorsqu'il est présent dans l'échantillon à tester, s'hybride à la fois (i) avec le premier acide nucléique appât qui est lié à certaines nanoparticules ou microparticules et (ii) avec le second acide nucléique appât qui est lié à certaines autres nanoparticules ou microparticules, ce qui génère des liaisons croisées ou « cross-links » entre le premier et le second type de nanoparticules ou microparticules.

Comme cela est montré dans les exemples, la création de liaisons croisées entre deux types de nanoparticules ou de microparticules, du fait de l'évènement d'hybridation d'un acide nucléique cible présent dans l'échantillon à tester simultanément à deux acides nucléiques appât spécifiques de deux régions distinctes dudit acide nucléique cible, a pour effet de stabiliser sélectivement ces deux types de nanoparticules ou de microparticules sur le dispositif de détection selon l'invention. Cet évènement de stabilisation sélective de deux types de nanoparticules ou de microparticules permet la mise en œuvre du dispositif de détection selon l'invention dans des procédés de détection possédant à la fois :

- (i) une grande spécificité de détection, puisque la présence de l'acide nucléique cible n'est détectée qu'après la formation de complexes d'hybridation avec deux acides nucléiques appâts, et non un seul acide nucléique appât, et
- (ii) une grande sensibilité de détection, puisque la génération de complexes d'hybridation avec deux acides nucléiques appâts, c'est à dire la formation de complexes d'hybridation incluant une grande longueur polynucléotidique de l'acide nucléique cible, aboutit à la formation de complexes très stables et à la détection de quantité très faibles de l'acide nucléique cible susceptible d'être présent dans l'échantillon à tester, de l'ordre de 10 femtomoles, et dans certains cas de l'ordre de 1 femtomole par mm^2 de détecteur.

Le mode de réalisation ci-dessus du dispositif de détection selon l'invention, du fait de sa grande spécificité et de sa grande sensibilité de détection, est parfaitement adapté à la détection de polymorphismes

nucléotidiques, notamment à la détection de polymorphismes nucléotidiques du type SNP, comme cela est illustré dans les exemples.

Selon une alternative au mode de réalisation ci-dessus, le dispositif de détection selon l'invention comprend au moins :

- 5 (i) un premier type de nanoparticules ou de microparticules auxquelles est lié un premier type d'acide nucléique s'hybridant à une première région d'un acide nucléique appât ; et
- (ii) un second type de nanoparticules ou de microparticules auxquelles est
lié un second type d'acide nucléique s'hybridant à une seconde région
10 d'un acide nucléique appât ;

Pour la mise en œuvre d'un tel dispositif, un acide nucléique appât capable de s'hybrider aux deux types de nanoparticules ou de microparticules est pré-incubé dans l'échantillon à tester. Si l'échantillon à tester contient l'acide nucléique cible correspondant, l'acide nucléique
15 appât s'hybride avec l'acide nucléique cible. Puis, lors du dépôt de l'échantillon pré-incubé avec l'acide nucléique appât sur le dispositif de détection, ledit acide nucléique appât ne s'hybride pas avec les acides nucléiques liés aux nanoparticules et aux microparticules, du fait que ledit acide nucléique appât est déjà hybridé avec l'acide nucléique cible
20 correspondant au sein de l'échantillon pré-incubé. Au contraire, si l'acide nucléique cible est absent de l'échantillon à tester, alors l'acide nucléique appât demeure sous une forme libre non hybridée lors de sa pré-incubation dans l'échantillon à tester. Puis, lors du dépôt de l'échantillon pré-incubé avec l'acide nucléique appât sur le dispositif de détection, ledit acide
25 nucléique appât s'hybride avec respectivement les deux types de nanoparticules ou de microparticules en les stabilisant sur le support de détection par création de liaisons croisées ou « crosslinks » entre les deux types de nanoparticules ou de microparticules. La stabilisation des deux types de nanoparticules ou de microparticules peut être détectée, par
30 exemple du fait d'une non-désorption de ces nanoparticules ou de ces microparticules, ou encore du fait d'un accroissement de la température à laquelle ces nanoparticules ou ces microparticules désorbent du support.

Selon encore d'autres modes de réalisation proches du mode de réalisation décrit immédiatement ci-dessus, le dispositif de détection selon
35 l'invention permet la détection de composés cibles capables de se lier

sélectivement sur des acides nucléiques comprenant une séquence cible donnée, comme par exemple des types variés de protéines capables de se fixer spécifiquement sur certaines séquences nucléotidiques. Dans ces modes de réalisation, l'acide nucléique appât peut consister en un acide nucléique sélectionné par une technique du type SELEX ou en un acide nucléique reconnu par des protéines cellulaires telles que des facteurs de transcription. Selon ces autres modes de réalisation, un dispositif de détection selon l'invention comprend au moins :

- (i) un premier type de nanoparticules ou de microparticules auxquelles un premier type d'acide nucléique comprenant une séquence s'hybridant à, par exemple complémentaire de, une première région d'un acide nucléique cible ;
- (ii) un second type de nanoparticules ou de microparticules auxquelles un second type d'acide nucléique comprenant une séquence s'hybridant à, par exemple complémentaire de, une seconde région d'un acide nucléique cible, distincte de la première région dudit acide nucléique cible ;
- (iii) un acide nucléique cible qui est hybridé à la fois au premier type et au second type d'acide nucléique ci-dessus, ce qui crée des liaisons croisées ou « cross-links » entre le premier type et le second type de nanoparticules et de microparticules.

Lors de la mise en œuvre du mode de réalisation ci-dessus d'un dispositif de détection, l'évènement de fixation du composé cible sur l'acide nucléique appât, par exemple la fixation d'un facteur de transcription présent dans l'échantillon à tester sur l'acide nucléique appât, stabilise sur le dispositif le complexe d'hybridation préformé entre l'acide nucléique appât et les deux types d'acides nucléiques liés aux deux types de nanoparticules ou de microparticules. Dans ce cas, la stabilisation du complexe d'hybridation préformé peut être détecté, du fait d'une modification des conditions de désorption des nanoparticules ou des microparticules, par exemple un accroissement de la valeur de la température à laquelle les nanoparticules ou les microparticules désorbent du support.

On peut aussi utiliser le mode de réalisation ci-dessus, dans lequel l'acide nucléique cible forme des liaisons croisées avec deux types de

nanoparticules ou de microparticules, dans des procédés de détection d'altération de l'acide nucléique cible soumis à un traitement physique, chimique ou enzymatique. Par exemple, une mutation de l'acide nucléique cible, par exemple généré par une exposition à un rayonnement U.V., ou
5 une coupure de l'acide nucléique cible, par exemple généré par l'action d'une endonucléase, réduit le nombre ou affaiblit les liaisons croisées entre les deux types de nanoparticules ou de microparticules, ce qui entraîne une réduction de la stabilité de ces nanoparticules ou de ces microparticules sur le support, ce qui peut être détecté, par exemple par un décroissement de
10 la valeur de la température à laquelle les nanoparticules ou les microparticules désorbent du support.

Dans tous les modes de réalisation du dispositif de détection qui sont décrits ci-dessus, qui comprennent au moins deux types de nanoparticules ou de microparticules, (i) le premier type d'acide nucléique spécifique d'une
15 première séquence polynucléotidique d'un acide nucléique donné et (ii) le second type d'acide nucléique spécifique d'une seconde séquence polynucléotidique dudit acide nucléique donné, peuvent être liés directement à la surfaces desdites nanoparticules ou desdites microparticules.

20 Alternativement, (i) le premier type d'acide nucléique et (ii) le second type d'acide nucléique sont liés de manière indirecte aux nanoparticules ou aux microparticules, par l'intermédiaire d'un acide nucléique de liaison. Dans ce mode de réalisation particulier d'un dispositif de détection conforme à l'invention, chacun des (i) premier type d'acide nucléique et (ii)
25 second type d'acide nucléique comprend :

- (a) une première séquence polynucléotidique capable de s'hybrider à, par exemple complémentaire de, une première région d'un acide nucléique donné, selon les cas une région d'un acide nucléique appât ou une région d'un acide nucléique cible ; et
- 30 (b) une seconde séquence polynucléotidique capable de s'hybrider à, par exemple complémentaire de, l'acide nucléique de liaison qui est lié directement aux nanoparticules ou aux microparticules.

En général, la première séquence (a) est fusionnée directement avec la seconde séquence (b). Dans certains cas, la première séquence (a) est
35 séparée de la seconde séquence (b) par un polynucléotide espaceur ayant

une longueur allant de 2 à 100 nucléotides de longueur, de préférence de 2 à 30 nucléotides de longueur.

Dans ce mode de réalisation, les acides nucléiques de liaison qui sont liés directement aux nanoparticules ou aux microparticules peuvent aussi être appelés « tags ». Les « tags » sont capables de s'hybrider aux séquences (b) définies ci-dessus, lesdites séquences (b) pouvant aussi être appelées « tags complémentaires ».

Selon encore un autre mode de réalisation particulièrement adapté à la détection de polymorphismes nucléiques y compris de polymorphismes du type SNP, l'acide nucléique cible consiste en un acide nucléique résultant de la fusion entre deux acides nucléiques de départ sous l'action d'une ligase. Selon un tel mode de réalisation, on détecte un polymorphisme nucléotidique à une localisation prédéterminée d'une séquence d'intérêt de référence, par exemple un polymorphisme SNP à une position nucléotidique donné d'un polynucléotide génomique.

Selon cet autre mode de réalisation, l'échantillon à tester comprend au moins des molécules d'un acide nucléique comprenant un site de polymorphisme SNP pour lequel on cherche à déterminer l'identité du nucléotide polymorphe. Tout d'abord, on pré-incube l'échantillon à tester avec une paire d'amorces complémentaires de la région de l'acide nucléique à tester qui comprend le site SNP, respectivement :

- (i) une première amorce comprenant, de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5',
 - (i1) une séquence complémentaire de la région de l'acide nucléique à tester, le nucléotide terminal du côté 3' de cette première amorce étant complémentaire du nucléotide définissant l'un des allèles possibles dudit site SNP et (i2) une première séquence « tag » complémentaire d'un premier acide nucléique appât lié à des nanoparticules ou des microparticules d'un dispositif de détection selon l'invention; et
- (ii) une seconde amorce comprenant, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3',
 - (ii1) une séquence complémentaire de la région de l'acide nucléique à tester, le nucléotide terminal du côté 5' de cette seconde amorce s'hybridant avec le nucléotide de l'acide nucléique à tester localisé immédiatement en 3' du nucléotide définissant ledit allèle du site SNP et (ii2) une seconde séquence « tag » complémentaire d'un second acide

nucléique appât lié à des nanoparticules ou des microparticules d'un dispositif de détection selon l'invention.

Ainsi, une fois hybridées à l'acide nucléique à tester, la première et la seconde amorce ci-dessus, se succèdent immédiatement sur l'acide nucléique à tester sans être chimiquement liées l'une à l'autre par une
5 liaison phosphodiester.

Si le nucléotide terminal en 3' de la première amorce (i) est complémentaire du nucléotide polymorphe correspondant localisé dans l'acide nucléique à tester, alors la première amorce (i) est totalement
10 hybridée à l'acide nucléique à tester, et la première amorce (i) et la seconde amorce (ii) peuvent être fusionnées entre elles sous l'action d'une ligase pour générer un acide nucléique dont la longueur est égale à la somme des longueurs nucléotidiques des première (i) et seconde (ii) amorces ci-dessus. L'acide nucléique qui consiste en les amorces fusionnées est un
15 acide nucléique cible capable de s'hybrider, par ses régions (i2) et (ii2), aux premier et second acides nucléiques appât du dispositif de détection avec lesquels il va créer des liaisons croisées ou « crosslinks ». Les liaisons croisées ainsi générées stabilisent les nanoparticules ou les microparticules correspondantes, ce qui peut ensuite être détecté par l'absence de
20 désorption des nanoparticules ou des microparticules, dans des conditions appropriées.

Au contraire, si le nucléotide terminal en 3' de la première amorce (i) n'est pas complémentaire du nucléotide polymorphe correspondant localisé dans l'acide nucléique à tester, alors l'extrémité 3' de la première amorce (i)
25 n'est pas hybridée à l'acide nucléique à tester et l'action d'une ligase ne génère pas la fusion entre la première amorce (i) et la seconde amorce (ii). Dans ce cas, le dépôt de l'échantillon sur le dispositif de détection ne provoquera pas de liaisons croisées ou « crosslinks » capables de stabiliser fortement les nanoparticules ou les microparticules. Cela peut être détecté
30 par la détection de la désorption des nanoparticules ou des microparticules, dans des conditions désorption identiques aux conditions de désorption appropriées ci-dessus.

De manière avantageuse, dans ce mode de réalisation, on peut utiliser de manière physiquement séparée, mais éventuellement
35 simultanément dans le temps, quatre types de première amorce (i) qui ne

diffèrent que par l'identité du nucléotide localisé à leur extrémité 3'(A, T, G ou C), afin de détecter positivement dans tous les cas l'identité du nucléotide localisé au site SNP de l'acide nucléique de départ à tester.

De manière préférée, les acides nucléiques appâts sont liés de
5 manière covalente à la surface des microparticules ou des nanoparticules.

A titre illustratif, comme cela est décrit dans les exemples, les acides nucléiques appâts peuvent être fonctionnalisés à leur extrémité 5' ou à leur extrémité 3' par des groupes alkylthio de formule (I) $\text{SH}-(\text{CH}_2)_n-$, dans laquelle n est un entier allant de 1 à 10, comme cela est décrit notamment
10 dans la demande de brevet US N°2003/0059777 publiée le 27 Mars 2003 (Nanosphere Inc.). Selon ce mode de réalisation décrit dans les exemples, les acides nucléiques appâts, qui possèdent une fonction alkylthio à leur extrémité 5' ou à leur extrémité 3', sont incubés avec des nanoparticules d'or colloïdal avec lesquelles ces acides nucléiques réagissent, par création
15 de liaisons covalentes avec la surface des nanoparticules. On peut par exemple utiliser les techniques décrites par Bain et Whitesides, (1989, Angew. Chem. Int. ed. Engl., vol.28 : 506-512) et Dubois et Nuzzo (1992, Annu. Rev. Phys. Chem., vol.43 : 437-464).

Dans un mode de réalisation particulier du dispositif de détection
20 selon l'invention, les microparticules ou les nanoparticules contiennent une molécule détectable par colorimétrie ou fluorimétrie. A titre illustratif, les microparticules ou les nanoparticules peuvent contenir un pigment ou une combinaison de pigments, soit sur la surface extérieure sur laquelle sont liés les composés appâts, soit dans la totalité de la masse desdites
25 microparticules ou nanoparticules.

Selon un autre mode de réalisation particulier du dispositif de détection de l'invention, la couche de phospholipides contient une molécule détectable par colorimétrie ou fluorimétrie, par exemple un pigment ou une combinaison de pigment.

Il n'existe pas véritablement de limites minimale ou maximale au
30 nombre de microparticules ou nanoparticules qui sont comprises dans le dispositif de détection selon l'invention. Le nombre de microparticules ou de nanoparticules compris dans le dispositif de détection dépend à la fois (i) de la surface du support solide de base et (ii) de la densité de microparticules
35 ou de nanoparticules par unité de surface dudit support solide de base.

En général, le dispositif de détection comprend au moins 100 microparticules ou nanoparticules par cm^2 de surface du support solide de base. Lorsqu'on utilise des nanoparticules, par exemple des nanoparticules d'un diamètre de 15 nm, le dispositif de détection de l'invention peut
5 comprendre jusqu'à au moins $5 \cdot 10^{10}$ nanoparticules par cm^2 .

La valeur de surface du support solide de base, qui détermine aussi la surface totale du dispositif de détection, est variable. Notamment, la surface du dispositif de détection de l'invention peut varier de $0,1 \mu\text{m}^2$ à 10 cm^2 , selon les cas et selon le type de support solide utilisé.

10 Selon un premier mode de réalisation, le support solide de base possède une surface plane, comme dans la plupart des supports de matrice d'oligonucléotides ou de protéines qui constituent les puces à ADN ou les puces à protéines. Dans ce mode de réalisation, la surface du support solide de base varie généralement de 1 à 10 cm^2 .

15 Selon un autre mode de réalisation particulier, le support solide de base consiste en des microparticules dont la plus grande dimension varie de 500 nanomètres à 2 millimètres

Selon encore un autre mode de réalisation particulier, le support solide de base est de forme sphérique. Il peut être constitué de billes ayant
20 une surface extérieure variant de $0,1 \mu\text{m}^2$ à 10 mm^2 .

De manière générale, un dispositif de détection tel que défini dans la présente description peut être inclus dans un ensemble comprenant une pluralité de dispositifs de détection conformes à l'invention, par exemple dans un ensemble de dispositifs de détection comprenant chacun des
25 composés appâts distincts, notamment des composés appâts distincts spécifiques de composés cibles distincts. Un tel ensemble de dispositifs de détection selon l'invention est aussi désigné « système de détection », dans la présente description.

De manière générale, un dispositif de détection tel que défini dans la présente description, ou encore un système de détection comme défini ci-dessus, est mis en œuvre dans un procédé de détection conforme à l'invention, à savoir un procédé de détection de la fixation d'un composé cible sur un composé appât, qui comprend les étapes suivantes :

a) mettre en contact un échantillon susceptible de contenir ledit composé
35 cible avec un dispositif de détection, ou avec un système de détection

selon l'invention, ledit dispositif ou ledit système comprenant au moins un composé appât se fixant sur ledit composé cible;

b) détecter les complexes éventuellement formés entre ledit composé cible et ledit composé appât.

5

Mode de réalisation du dispositif comprenant un support solide semi-conducteur

Comme déjà mentionné précédemment dans la description, le support solide du dispositif de l'invention peut comprendre une surface semi-conductrice en contact avec le revêtement. Alternativement, le support solide peut consister essentiellement ou intégralement en un matériau semi-conducteur en contact avec le revêtement.

Par exemple, le support solide peut consister en un support de silicium de type n ou de type p, qui possède au moins un contact ohmique localisé sur au moins l'une de ses surfaces. La surface opposée du support de silicium peut être recouverte par au moins un film de SiO₂ d'une épaisseur allant de 10 à 500 angströms, mieux de 50 à 150 angströms, par exemple une épaisseur de 100 angströms.

Dans ce mode de réalisation spécifique, le revêtement est choisi préférentiellement parmi les revêtements électriquement isolants, comme certains polymères isolants ou encore les phospholipides, qui sont des revêtements précédemment indiqués dans la présente description.

Dans ce mode de réalisation, les macroparticules ou les microparticules sont préférentiellement recouvertes d'un matériau électriquement conducteur. Alternativement, les macroparticules ou les microparticules sont essentiellement ou intégralement constituées d'un matériau électriquement conducteur. Le matériau électriquement conducteur peut être choisi parmi les matériaux conducteurs d'électricité précédemment indiqués dans la présente description, tels les métaux électriquement conducteurs comme l'or.

En conditions d'utilisation, le dispositif de détection décrit ci-dessus est immergé dans un liquide électriquement conducteur, tel qu'une solution tampon, par exemple une solution d'un tampon phosphate à une concentration variant de 0,1M à 1M.

La combinaison dispositif/milieu liquide électro-conducteur constitue un système de détection selon l'invention.

Pratiquement, on applique une tension entre le support semi-conducteur et le liquide électriquement conducteur.

5 La (i) désorption des microparticules ou nanoparticules ou inversement (ii) le blocage de la désorption par formation de complexes entre les composés appâts immobilisés sur le dispositif et des composés cibles peuvent être détectées, de manière qualitative et/ou de manière quantitative, par une mesure des variations des signaux électriques
10 provoquées par la formation desdits complexes.

Avec un tel dispositif, on peut détecter la désorption ou le blocage de la désorption des microparticules ou nanoparticules en mesurant les composantes de capacité et/ou de résistivité de l'impédance électrique du système pour une tension déterminée, puis en comparant ces composantes
15 aux composantes d'un système de référence ou d'un système témoin qui comprend les composés appâts sous forme libre, c'est à dire non complexés avec des composés cibles. Avec un tel dispositif de l'invention, la désorption des microparticules ou nanoparticules est détectée par une variation de la valeur de capacitance ou par une variation de la valeur de
20 résistance du système dispositif / milieu liquide conducteur, par rapport au système de référence ou au système témoin.

En utilisant un tel dispositif de l'invention, la désorption des microparticules ou nanoparticules est accompagnée par un effet de charge et, incidemment, par une variation du potentiel « flat-band » V_{bp} du semi-
25 conducteur. Le potentiel « flat-band » V_{bp} est le potentiel qui doit être appliqué au système dispositif / milieu liquide conducteur pour que la valeur de courbure de la bande semi-conductrice soit nulle. Le potentiel « flat-band » V_{bp} peut être déterminé conformément à la courbe d'impédance de quadrature, par application de la relation bien connue de Mott-Schottky.

30 Ce phénomène d'effet de charge a lieu à l'interface entre le milieu liquide électriquement conducteur et la surface électro-conductrice des macroparticules ou des microparticules du dispositif de l'invention.

Pour mettre en œuvre un procédé de détection de composés cibles avec un tel système dispositif / milieu électro-conducteur, lorsque l'on veut
35 réaliser une mesure potentiostatique, on utilise de préférence au moins trois

électrodes, respectivement (1) au moins une électrode de travail qui est le dispositif de l'invention lui-même, (2) au moins une électrode de référence qui constitue le système de référence, par exemple une électrode du type Ag/AgCl, et (3) au moins une contre-électrode.

5 Avec un tel système de détection, on mesure les valeurs d'impédance, ce qui permet de construire la courbe d'impédance de phase (Z_p) et la courbe d'impédance de quadrature (Z_q), en fonction de la tension (V).

10 Le déplacement des courbes d'impédance dans une direction parallèle à l'axe des potentiels, qui est provoqué par la désorption de la combinaison revêtement/microparticules ou nanoparticules, correspond aux variations du potentiel des bandes plates (« flat bands ») au sein de la structure composite du dispositif de l'invention.

15 Le dispositif de détection, dans toutes ses variantes définies ci-dessus, est destiné à être mis en œuvre dans un procédé pour détecter la fixation d'un composé cible sur un composé appât compris dans ledit dispositif de détection, comme détaillé ci-dessous.

20 **Mode de réalisation du dispositif sous la forme de microparticules**

Comme déjà mentionné précédemment dans la présente description, dans un mode de réalisation particulier d'un dispositif de détection conforme à l'invention, ledit dispositif se présente sous la forme d'une microparticule.

25 Dans ce mode de réalisation, le support solide de base consiste en des microparticules dont la surface externe ou la totalité de la masse consiste en l'un des divers matériaux pour le support solide qui sont indiqués dans la présente description.

30 Conformément à la définition générale d'un dispositif de détection selon l'invention, la surface externe des microparticules de support solide est recouverte d'un revêtement, lié de manière non covalente à la surface du support solide.

35 Une pluralité de nanoparticules sur lesquelles est fixé au moins un composé appât sont liées au revêtement, le revêtement étant lui-même appliqué à la surface des microparticules de support solide.

Avantageusement, les microparticules de support solide sont caractérisées en ce que leur plus grande dimension varie de 500 nanomètres à 2 millimètres, préférentiellement de 1 μm à 1000 μm et de manière tout à fait préférée de 1 μm à 500 μm . On peut utiliser notamment
5 des microparticules de support solide dont la plus grande dimension varie de 5 μm à 200 μm .

Les microparticules de support solide peuvent avoir des formes géométriques variées. En particulier, les microparticules de support solide peuvent être de forme cubique, parallélépipédique ou encore ovoïde ou
10 sphérique.

Les microparticules de support solide peuvent avoir des couleurs variées, afin d'absorber, selon le type de microparticule, des longueurs d'onde distinctes du spectre lumineux. Les microparticules peuvent être teintées dans la masse, par exemple dans le cas d'un support solide en
15 verre ou en polymère. Alternativement, les microparticules de support solide peuvent être teintées uniquement sur leur surface, par exemple dans le cas d'un support solide en métal.

Les microparticules de support solide peuvent aussi être fluorescentes. Selon l'invention, on peut utiliser toute microparticule
20 fluorescente couramment retrouvée dans le commerce. Notamment, on peut utiliser les microparticules fluorescentes d'un diamètre de 10 μm ou d'un diamètre de 15 μm commercialisées par la Société Molecular Probes sous la marque FluoroSpheres®. Avantageusement, on peut utiliser les microparticules fluorescentes FluoroSpheres® suivantes, caractérisées par
25 leur longueur d'onde d'absorption maximale et leur longueur d'onde d'émission maximale (Abs/Em), lorsqu'elles sont en suspension dans de l'eau : « Blue » (365/415) ; « Blue-green » (430/465), « Green » (450/480), « Yellow-green » (505/515), « Yellow » (515/534), « Orange » (540/560), « Red-orange » (565/580), « Red » (580/605), « Carmine » (580/620),
30 « Crimson » (625/645) and « Scarlet » (645/680).

Alternativement, un dispositif de détection de l'invention, sous forme de microparticules, peut avoir des couleurs variées, ou posséder des propriétés de fluorescence, par inclusion d'un pigment ou d'une
35 combinaison de pigments, ou encore d'un fluorochrome ou d'une combinaison de fluorochromes, dans le revêtement lié à la surface du

support solide. Par exemple, lorsque le revêtement consiste en une couche de phospholipides, on peut ajouter le ou les pigment(s) ou encore le ou les fluorochrome(s) aux phospholipides de départ, préalablement à l'application du revêtement de phospholipides sur le support solide. Par exemple, on
 5 peut utiliser des molécules marquées, colorées ou fluorescentes, qui ont une affinité pour les phospholipides, tels que des acides gras marqués ou du cholestérol marqué, colorés ou fluorescents. On peut aussi utiliser des phospholipides marqués par des pigments ou des fluorochromes

Dans l'alternative selon laquelle le revêtement, par exemple la
 10 couche de phospholipides, comprend des molécules fluorescentes, ledit revêtement peut comprendre une combinaison de deux fluorochromes, le premier fluorochrome ayant une longueur d'onde d'émission maximale identique à, ou différant au maximum de 5 nanomètres par rapport à, la longueur d'onde d'absorption maximale du second fluorochrome. Dans un
 15 tel mode de réalisation, on peut distinguer facilement entre deux dispositifs microparticulaires de détection de l'invention, dont les revêtements respectifs comprennent la même combinaison spécifique de deux fluorochromes, mais pour lesquels les deux fluorochromes sont présents dans des proportions distinctes.

20 Comme phospholipides fluorescents, on peut utiliser les phospholipides fluorescents commercialisés par la Société Molecular Probes (Orégon, Etats-Unis), tels que notamment les phospholipides suivants : 2-(5-butyl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-nonanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (-C4-BODIPY® 500/510 C9-HPC),
 25 2-(4,4-difluoro-5,7-diméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (-BODIPY® FL C12-HPC), sel de diammonium de 2-(4,4-difluoro-5,7-diméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphate (-BODIPY® FL C5-HPA), 2-(4,4-difluoro-5,7-diméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (-
 30 BODIPY® FL C5-HPC), sel de triéthylammonium de N-(4,4-difluoro-5,7-diméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (BODIPY® FL DHPE), sel de triéthylammonium de N-(4,4-difluoro-5,7-diméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-
 35

propionyl)-1,2-dihexanoyl-sn- glycerol-3-phosphoethanolamine (BODIPY® FL dicaproyl PE), 2-(4,4-difluoro-5,7-diphenyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycerol-3- phosphocholine (-BODIPY® 530/550 C5-HPC), sel de triethylammonium de N-(4,4-difluoro-5,7-diphenyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn- glycerol-3-phosphoethanolamine (BODIPY® 530/550 DHPE), 2-(4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a- diaza-s-indacene-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycerol-3- phosphocholine (-BODIPY® 500/510 C12-HPC), 2-(4,4-difluoro-5-octyl-4-bora-3a,4a- diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycerol-3- phosphocholine (-C8-BODIPY® 500/510 C5-HPC), 2-(4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3- butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl- sn-glycerol-3-phosphocholine (-BODIPY®581/591 C5-HPC), sel de triethylammonium de N-(5-dimethylaminonaphthalene-1- sulfonyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (dansyl DHPE), 2-(3-(diphenylhexatrienyl)propanoyl)-1- hexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (-DPH HPC), sel de triethylammonium de N-(DMNB-caged fluorescein)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine, sel de triethylammonium de N-(fluorescein-5-thiocarbamoyl)- 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (fluorescein DHPE), 1-hexadecanoyl-2-(3-perylenedodecanoyl)- sn-glycerol-3-phosphocholine-1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenehexanoyl)- sn-glycerol-3-phosphocholine(-py-C6-HPC), sel de triethylammonium de LissamineT rhodamine B 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (rhodamine DHPE), sel de triethylammonium de N-((4-maleimidylmethyl) cyclohexane-1-carbonyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3- phosphoethanolamine (MMCC DHPE), Marina Blue® 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3- phosphoethanolamine (MarinaBlue® DHPE), sel de triethylammonium de N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol- 4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (NBD-PE), Oregon Green® 488 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (Oregon Green® 488 DHPE), sel de triethylammonium de Pacific BlueT 1,2-ditetradecanoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (Pacific BlueT DMPE), sel de triethylammonium de N-(1-pyrenesulfonyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (pyS DHPE), N-((2-pyridyldithio)propionyl)-1, sel de

triethylammonium de 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (PDP DHPE), sel de triethylammonium de Rhodamine RedT-X 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Rhodamine RedT-X DHPE), sel de triethylammonium de N-(6-tetramethylrhodaminethiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (TRITC DHPE), sel de triethylammonium de Texas Red® 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Texas Red® DHPE), et sel de triethylammonium de Texas Red®-X 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Texas Red®-X DHPE).

Comme acides gras fluorescents, on peut utiliser les acides gras fluorescents commercialisés par la Société Molecular Probes (Orégon, Etats-Unis), tels que notamment les acides gras fluorescents suivants : acide 5-butyl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-nonanoïque (BODIPY®500/510 C4, C9), acide 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoïque (BODIPY® FL C12), acide 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-hexadecanoïque (BODIPY® FL C16), acide 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoïque (BODIPY® FL C5), acide 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoïque (BODIPY® FL C11), acide 4,4-difluoro-5,7-diphenyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoïque (BODIPY® 530/550 C12), acide 4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoïque (BODIPY® 500/510 C1, C12), acide 4,4-difluoro-5-octyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoïque (BODIPY® 500/510 C8, C5) acide 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoïque (BODIPY® 581/591 C5), acide 4,4-difluoro-5-(2-pyrrolyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoïque (BODIPY® 576/589 C11), acide 4,4-difluoro-5-styryl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoïque (BODIPY® 564/570 C5), acide 4,4-difluoro-5-styryl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoïque (BODIPY® 564/570 C11), acide 4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-nonanoïque (BODIPY® 493/503 C9), acide 4,4-difluoro-5-(2-thienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoïque (BODIPY® 558/568 C12), acide 12-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)dodecanoïque, acide 6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)hexanoïque (NBD-X), acide 13-

perylene-dodecanoïque, acide 1-pyrènebutanoïque, acide 1-pyrène-dodecanoïque, acide 1-pyrènehexadecanoïque, et acide 1-pyrènehexanoïque.

Avantageusement, les nanoparticules sur lesquelles sont fixés les composés appâts sont caractérisées en ce que leur plus grande dimension varie de 3 à 100 nanomètres, préférentiellement de 3 à 50 nanomètres. On peut utiliser notamment des nanoparticules dont la plus grande dimension varie de 10 à 20 nanomètres, par exemple des nanoparticules de 15 nanomètres.

Compte tenu de la description qui précède, la forme finale du dispositif de détection consiste en une microparticule sur laquelle sont exposés des composés appâts.

Préférentiellement, dans ce mode de réalisation, chaque dispositif de détection, sous forme finale d'une microparticule à la surface de laquelle sont exposés les composés appâts, comprend un seul type de composé appât par dispositif ou microparticule. Par exemple, lorsque le composé appât consiste en un acide nucléique appât, le dispositif de détection microparticulaire de l'invention comprend, fixées sur celui-ci, une pluralité de molécules d'un acide nucléique unique.

Alternativement, chaque dispositif de détection microparticulaire tel que défini ci-dessus comprend plus d'un type de composé appât, à condition que les types distincts de composés appâts se fixent spécifiquement sur un composé cible unique. Par exemple, lorsque le composé appât consiste en un acide nucléique appât, le dispositif microparticulaire de l'invention comprend, fixées sur celui-ci, (i) une pluralité de molécules d'un acide nucléique [1] appât spécifique d'un composé cible déterminé, (ii) une pluralité de molécules d'un acide nucléique [2] appât, distinct de l'acide nucléique [1], également spécifique dudit même composé cible déterminé, ..., et (i + n-1) une pluralité de molécules d'un acide nucléique [n] appât, distinct de chacun des acides nucléiques [i] à [i+n-1], spécifique dudit même composé cible déterminé. Par exemple, les acides nucléiques appâts [i] à [n] distincts s'hybrident spécifiquement à des séquences nucléotidiques distinctes comprises dans un unique acide nucléique cible déterminé.

Conformément à ce mode de réalisation de l'invention, dans lequel le support solide consiste en des microparticules, le procédé de détection consiste en la mise en œuvre d'un « système de détection », ledit système de détection comprenant une pluralité de dispositifs de détection distincts
5 conformes à l'invention, c'est à dire une pluralité de dispositifs microparticulaires distincts tels que définis ci-dessus. On comprend que chaque dispositif de détection microparticulaire est capable de fixer spécifiquement un composé cible donné.

Un système de détection tel que défini ci-dessus, du fait qu'il
10 comprend une pluralité de dispositifs de détection microparticulaires selon l'invention, est adapté à la détection d'une pluralité de composés cibles distincts.

Préférentiellement, dans un tel système de détection, chaque dispositif de détection spécifique d'un composé cible déterminé, ou d'un
15 domaine ou d'une séquence dudit composé cible déterminé, peut être distingué des autres dispositifs de détection spécifiques d'un composé cible distinct, ou d'un domaine ou d'une séquence distincte du même composé cible.

Selon un premier aspect, les différents dispositifs microparticulaires,
20 compris dans un système de détection selon l'invention peuvent être distingués, l'un par rapport à chacun des autres, par leur forme ou encore par leur taille, c'est à dire essentiellement par la forme ou par la taille du support solide de base utilisé.

Selon un second aspect, les différents dispositifs microparticulaires,
25 compris dans un système de détection selon l'invention, peuvent être distingués, l'un par rapport à chacun des autres, par leur couleur ou encore par leurs caractéristiques de fluorescence, par exemple la longueur d'onde spécifique d'émission d'un signal lumineux, c'est à dire essentiellement par la couleur ou par les caractéristiques de fluorescence du support solide de
30 base utilisé.

Dans une première illustration préférée d'un système de détection de l'invention comprenant une pluralité de dispositifs de détection microparticulaires, les microparticules spécifiques de composés cibles distincts, ou de domaines ou de séquences distincts d'un composé cible
35 déterminé, se distinguent, l'un par rapport à chacun des autres, par leur

taille de microparticule. Par exemple, un premier dispositif de détection microparticulaire spécifique d'un premier composé cible comprend une microparticule de support solide sphérique ayant un diamètre variant de 10 à 30 μm . Un second dispositif de détection microparticulaire spécifique d'un
5 second composé cible comprend une microparticule de support solide sphérique ayant un diamètre variant de 50 à 100 μm .

Dans un procédé de détection conforme à l'invention qui utilise un tel système de détection, la formation de complexes entre les composés appâts et le composé cible, sur un premier type de dispositif
10 microparticulaire de détection bloque la désorption du revêtement sur lequel sont fixées les nanoparticules comprenant les composés appâts. Dans le même temps, pour un second type de dispositif microparticulaire de détection, il y a une désorption du revêtement sur lequel sont fixés les composés appâts non spécifiques dudit composé cible, en raison de
15 l'absence de formation de complexes avec ledit composé cible. Lorsque les nanoparticules sur lesquelles sont fixés les composés appâts sont colorées, comme c'est le cas par exemple pour des nanoparticules d'or, la désorption des nanoparticules provoque un changement de la couleur du dispositif microparticulaire de détection.

20 Ainsi, dans ce mode de réalisation d'un système de détection, on détermine, à l'étape b) du procédé de détection de l'invention :

(i) d'une part, les dispositifs microparticulaires de détection qui ont fixé le composé cible, par détection, par exemple colorimétrique, des dispositifs microparticulaires pour lesquels la désorption des
25 nanoparticules est bloquée ; et

(ii) l'identité du composé appât compris dans les dispositifs microparticulaires qui ont fixé le composé cible, par exemple par détermination de la taille de ces dispositifs microparticulaires, car l'on connaît à l'avance la taille spécifique d'un dispositif microparticulaire
30 sur lequel on a préalablement fixé un composé appât déterminé.

Dans la majorité des cas, la connaissance de l'identité du composé appât impliqué dans un complexe avec un composé cible permet d'identifier directement ledit composé cible, du fait de la spécificité de reconnaissance d'un composé cible déterminé par ledit composé appât, notamment lorsque

le composé appât consiste en un acide nucléique ou encore un anticorps ou un fragment d'anticorps.

Un système de détection tel que défini ci-dessus est illustré à l'exemple 8. Dans l'exemple 8, les dispositifs microparticulaires de détection
5 comprennent des microparticules de support solide en verre, sur lesquelles est adsorbée un revêtement consistant en une couche de phospholipides. Sur la couche de phospholipides sont fixées des nanoparticules d'or liées de manière covalente à des acides nucléiques appâts. Dans le système de détection décrit à l'exemple 8, un premier dispositif microparticulaire de
10 détection comprenant des molécules d'un premier acide nucléique appât se distingue d'un second dispositif microparticulaire de détection comprenant des molécules d'un second acide nucléique par la taille de la microparticule du support solide de base. Lors de l'utilisation d'un tel système de détection, les dispositifs microparticulaires ayant fixé le composé cible sont
15 détectés par la couleur rouge spécifique des nanoparticules d'or, qui n'ont pas été désorbées du support solide. L'identité de l'acide nucléique appât qui a formé des complexes avec l'acide nucléique cible est déterminée par cytométrie ou microscopie, en mesurant la taille des dispositifs microparticulaires ayant fixé l'acide nucléique cible.

20 Selon une autre illustration de l'utilisation d'un système de détection conforme à l'invention, dans un procédé de détection, la détermination (i) des dispositifs microparticulaires ayant fixé le composé cible et (ii) de l'identité du composé appât ayant formé des complexes avec ledit composé cible peut être réalisée simultanément, avec la même technique ou le
25 même moyen de mesure.

Par exemple, on utilise des dispositifs microparticulaires de spécificité distincte qui se distinguent, l'un par rapport à chacun des autres, par la longueur d'onde du signal de fluorescence émis après excitation à une longueur d'onde unique donnée. De plus, on utilise des nanoparticules
30 sur lesquelles sont fixés les composés appâts qui ont la propriété d'absorber la lumière, à la longueur d'onde unique d'excitation ci-dessus.

Lorsqu'on utilise le système de détection défini ci-dessus, dans un procédé de détection conforme à l'invention, l'étape b) de détection est réalisée en illuminant ledit système de détection à la longueur d'onde
35 unique d'excitation, puis en analysant le spectre d'émission lumineuse

résultant. Dans ce mode de réalisation, les dispositifs microparticulaires de détection ayant fixé le composé appât sont détectés car ils absorbent la lumière, à la longueur d'onde unique d'excitation. De plus, l'identité du composé appât ayant fixé le composé cible est déterminé par analyse
5 spectrale de la longueur d'onde du signal de fluorescence émis par l'ensemble des dispositifs microparticulaires contenus dans le système de détection et détermination de la bande de longueur d'onde manquante. La bande de longueur d'onde manquante correspond à la longueur d'onde d'émission du fluorochrome inclus dans le dispositif de détection qui a fixé
10 le composé cible, pour lequel la lumière, à la longueur d'onde d'émission est absorbée par les nanoparticules comprenant les composés appâts, qui n'ont pas été désorbées du support solide.

Un tel système de détection de l'invention est illustré par l'utilisation de dispositifs microparticulaires de détection comprenant des
15 microparticules de support solide fluorescentes, lesquelles se distinguent les unes par rapport aux autres par la longueur d'onde du signal de fluorescence émis après excitation à une longueur d'onde d'excitation inférieure à 550 nanomètres. Dans ces dispositifs microparticulaires de détection, les composés appâts sont fixés sur des nanoparticules d'or, qui
20 absorbent la lumière aux longueurs d'onde d'excitation inférieures à 550 nanomètres.

Par exemple, on peut utiliser des microparticules de support solide dont le matériau de base comprend un composé fluorochrome ayant une longueur d'onde d'excitation de 488 nanomètres.

25 Le composé fluorochrome ayant une longueur d'onde d'excitation de 488 nanomètres peut être choisi parmi les composés fluorochrome suivants : FITC (émission 525nm), Alexa fluor 488 (émission 525nm), PE (émission 575nm), PE-texas red (émission 613nm), PE- Cy 5 , PerCP-Cy5.5 (émission 695nm), PE-Cy7 (émission 760nm).

30 Ainsi, à l'étape b) d'un procédé de détection conforme à l'invention, on illumine l'ensemble du système de détection avec une source lumineuse à la longueur d'onde de 488 nanomètres, puis on détermine, l'identité du composé appât qui a formé des complexes avec le composé cible, par détermination de la bande de longueur d'onde d'émission du signal
35 fluorescent desdits dispositifs de détection qui n'apparaît plus dans le

spectre d'émission, du fait de l'absorption de la lumière d'excitation à 488 nanomètres et de la lumière émise par lesdits dispositifs de détection.

Le mode de réalisation d'un système de détection comprenant une pluralité de dispositifs microparticulaires de détection selon l'invention
5 présentent de nombreux avantages, par rapport aux systèmes de détection connus.

Notamment, l'identification des composés appâts ayant fixé le composé cible peut être réalisée par simple mesure d'au moins une propriété physique de la pluralité des dispositifs microparticulaires de
10 détection compris dans le système de détection, cette mesure pouvant être réalisée rapidement et aisément à l'aide d'un cytomètre ou encore d'un microscope, par exemple un microscope à fluorescence.

Dans la seconde illustration ci-dessus d'un système de détection de l'invention comprenant une pluralité de dispositifs microparticulaires de
15 détection, l'identification des composés appâts ayant fixé le ou les composé(s) cible(s) contenu(s) dans l'échantillon à tester peut être très rapide, puisque la mesure des bandes d'émission du spectre lumineux peut être réalisé instantanément et simultanément pour la totalité des dispositifs microparticulaires de détection compris dans le système, par exemple à
20 l'aide d'un spectromètre de fluorescence. Une telle mesure du spectre d'émission ne nécessite même pas la mise en œuvre d'un dispositif du type cytomètre, qui impose le passage successif de tous les dispositifs microparticulaires de détection devant un ou plusieurs détecteurs. De plus, la mesure du spectre d'émission est très sensible et ne nécessite pas
25 d'appareillage complexe.

Lorsque les dispositifs microparticulaires de détection compris dans un système de détection de l'invention comprennent chacun une combinaison d'au moins deux fluorochromes, dans une proportion spécifique donnée, le procédé de détection de l'invention peut être réalisé
30 avec un dispositif cytomètre de flux, ce qui permet de détecter à la fois (i) la diffusion de la lumière, pour différencier les dispositifs microparticulaires de détection par la taille de particule, (ii) la proportion de chaque fluorochrome, pour différencier les dispositifs microparticulaires de détection par les pics de fluorescence, et/ou (iii) l'intensité de fluorescence et/ou la diffusion de la
35 lumière pour la détection de la présence ou non des nanoparticules

comprenant les composés appâts, pour détecter la fixation ou non du ou des composé(s) cible(s).

Procédé de détection selon l'invention

5 L'invention a également pour objet un procédé pour détecter la fixation d'un composé cible sur un composé appât, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) mettre en contact un échantillon susceptible de contenir ledit composé cible avec un dispositif de détection tel que défini ci-dessus, ledit
10 dispositif comprenant au moins un composé appât se fixant sur ledit composé cible ;

b) détecter les complexes éventuellement formés entre ledit composé cible et ledit composé appât.

Comme déjà détaillé précédemment dans la présente description, on
15 a montré selon l'invention que, de manière surprenante, on provoque la désorption des microparticules ou nanoparticules à partir lorsqu'on modifie les conditions d'environnement auxquelles est soumis le dispositif de détection, en l'absence de formation de complexes entre les composés appâts et les composés cibles susceptibles d'être contenus dans
20 l'échantillon à tester. En revanche, on a montré que la désorption était bloquée par la formation de complexes entre les composés appâts et les composés cibles.

Ainsi, le procédé de détection ci-dessus est aussi caractérisé en ce que l'étape b) comprend les sous-étapes suivantes :

25 b1) on soumet le dispositif à des conditions d'environnement dans lesquelles les microparticules ou les nanoparticules sont désorbés de la surface du support solide, en l'absence de formation de complexes entre le (s) composé (s) appât(s) et le (s) composé(s) cible (s) ;

b2) on détecte la désorption des microparticules ou des
30 nanoparticules à partir de la surface du support solide.

Préférentiellement, à l'étape b) du procédé de détection, on soumet le dispositif à des conditions d'environnement dans lesquelles les interactions entre la couche et le support, notamment celles électrostatiques, sont affaiblies voire inversées et/ou les interactions entre

la couche et les nanoparticules, notamment celles électrostatiques, sont renforcées.

Dans certains modes de réalisation de l'étape b) ou b1) du procédé ci-dessus, on soumet le dispositif à des conditions d'environnement dans lesquelles les microparticules ou les nanoparticules sont désorbés de la surface du support solide, en l'absence de formation de complexes entre le(s) composé(s) appât(s) et le(s) composé(s) cible(s), en incubant ou en immergeant le dispositif de détection dans une solution à forte concentration de chlorure ou de bromure.

Dans certains autres modes de réalisation de l'étape b) ou b1) du procédé ci-dessus, on soumet le dispositif à des conditions d'environnement dans lesquelles les microparticules ou les nanoparticules sont désorbés de la surface du support solide, en l'absence de formation de complexes entre le (s) composé (s) appât(s) et le (s) composé(s) cible (s), en ajoutant des macromolécules possédant une charge de même polarité que la charge des nanoparticules ou des microparticules. Ainsi, lorsque le dispositif de détection comprend des nanoparticules ou des microparticules de charge nette positive en solution à pH neutre, on utilise à l'étape b) ou b1) des macromolécules qui possèdent aussi une charge nette positive dans les mêmes conditions d'environnement. A l'inverse, lorsque le dispositif de détection comprend des nanoparticules ou des microparticules de charge nette négative en solution à pH neutre, on utilise à l'étape b) ou b1) des macromolécules qui possèdent aussi une charge nette négative dans les mêmes conditions d'environnement.

Comme macromolécules possédant une charge nette négative en solution en pH neutre, on peut utiliser notamment le sulfate de dextran.

Selon ces autres modes de réalisation de l'étape b) ou b1) du procédé, les macromolécules chargées qui sont ajoutées provoquent la désorption des nanoparticules ou des microparticules qui n'ont pas été stabilisées sur le support du fait de la liaison de composés cibles sur les composés appâts.

La concentration finale des macromolécules qui est ajoutée à l'étape b) ou b1) du procédé peut être aisément adaptée par l'homme du métier, selon le type de macromolécule ajoutée et selon la force de l'effet de déplacement qui est recherchée. Par exemple, si la fixation du composé

cible sur le composé appât ne provoque pas la création de liaisons croisées ou « crosslinks » entre deux types de nanoparticules ou de microparticules du dispositif, la fixation du composé cible provoquera une stabilisation des nanoparticules ou des microparticules, mais cette
5 stabilisation est moins grande que lorsque des liaisons croisées sont créées. Dans ce cas, on utilise, à l'étape b) ou b1) du procédé, une concentration finale plus faible de macromolécules pour désorber les nanoparticules ou les microparticules qui n'ont pas fixé de composé cible que lorsque la fixation du composé cible provoque la création de liaisons
10 croisées.

Par exemple, pour détecter la stabilisation des nanoparticules ou des microparticules ayant fixé le composé cibles, lorsqu'il y a création de liaisons croisées entre deux types de nanoparticules ou de microparticules, on utilise couramment une concentration finale de sulfate de dextran d'au
15 moins 0,1 pour cent en poids par rapport au volume total de la solution finale dans laquelle est immergé le dispositif de détection selon l'invention.

On utilise en général une concentration finale de sulfate de dextran allant de 0,1 % à 5 % en poids par rapport au volume total de la solution finale. A titre illustratif, une concentration finale de sulfate de dextran de 0,5
20 % en poids par rapport au volume total de la solution finale se révèle adaptée dans la plupart des cas.

Différentes mises en œuvre du procédé de détection selon l'invention sont illustrées dans les exemples.

Les exemples 3 à 6 illustrent diverses mises en œuvre du procédé de détection selon l'invention appliquées avec un dispositif de détection
25 comprenant les acides nucléiques appâts.

Dans un mode de réalisation particulier de l'étape b1), le dispositif de détection est incubé ou immergé dans une solution de NaCl ayant une concentration finale d'au moins 0,5 M, de préférence une concentration
30 finale allant de 0,5 M à 2 M, la concentration finale étant de manière tout à fait préférée de 1 M.

Selon un autre mode de réalisation préféré du procédé, à l'étape b1), on incube ou on immerge le dispositif de détection dans une solution de KCl ayant une concentration finale d'au moins 0,2 M, de préférence une

concentration finale allant de 0,2 M à 1 M, la concentration finale étant de manière tout à fait préférée de 0,4 M .

Les exemples 9 et 10 illustrent diverses mises en œuvre du procédé de détection selon l'invention dans lesquelles l'étape b) ou b1) du procédé est réalisée avec, comme macromolécules chargées, des macromolécules de sulfate de dextran.

Selon un premier mode de réalisation particulier de l'étape b2) du procédé de détection de l'invention, la désorption des microparticules ou nanoparticules est détectée par un changement de couleur de la surface du dispositif.

Par exemple, lorsqu'on utilise des microparticules ou des nanoparticules à base d'or, la surface du dispositif possède une coloration rouge. L'événement de désorption des microparticules ou des nanoparticules de la surface du dispositif provoque simultanément une décoloration de la surface du dispositif et une coloration de la solution dans lequel le dispositif est immergé ou incubé. Ce changement de couleur peut être observé simplement à l'œil nu. Toutefois, ce changement de couleur peut être mesuré par des dispositifs d'imagerie et/ou de mesure de la colorimétrie couramment commercialisés.

Un changement de couleur du dispositif peut également être obtenu avec des types variés de microparticules ou de nanoparticules, par exemple en utilisant des microparticules ou des nanoparticules dont au moins la surface extérieure comprend un pigment ou des combinaisons de pigment ou encore des microparticules ou des nanoparticules teintées avec des pigments directement dans leur masse.

Egalement, un changement de couleur est observé, au moment de l'événement de désorption, lorsque la couche de phospholipides comprend elle-même un pigment ou une combinaison de pigments.

Dans tous les cas, la désorption des microparticules ou des nanoparticules à partir de la surface du dispositif de détection provoque des modifications des propriétés physico-chimiques du dispositif de détection, autres que le simple changement de couleur.

En effet, l'événement de désorption des microparticules ou des nanoparticules à partir de la surface du support solide provoque des changements importants de la charge pondérale dudit support solide et

entraîne d'importantes modifications de la plupart des propriétés physico-chimiques du dispositif, telle que son impédance électrique ou sa conductivité électriques, son potentiel Zeta, ses propriétés optiques ou encore sa capacité à transmettre une onde sonore ou électromagnétique.

5 Ainsi, selon un autre mode de réalisation particulier du procédé de détection de l'invention, à l'étape b2), on détecte la désorption des microparticules ou des nanoparticules par une modification de la valeur d'une onde acoustique traversant le support solide du dispositif.

10 Par exemple, à l'étape b2), la modification de la valeur d'une onde acoustique peut consister en une modification de la fréquence de ladite onde acoustique, par exemple comme mesurée selon la technique QCM-D.

15 La technique QCM-D (pour « Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring ») est une technique qui permet de mesurer, en temps réel, l'adsorption et la désorption de molécules sur des surfaces solides, ou encore l'interaction entre molécules sur des surfaces solides. Elle est décrite notamment par Richter et al. (2003, Biophysical Journal, vol.85 : 3035-3047). Elle peut être mise en œuvre avec un dispositif Q-Sense D300 commercialisé par la Société Q-Sense AB (Gothenburg, Suède). Plus précisément, selon la technique QCM-D, l'adsorption ou la
20 désorption d'analytes sur un crystal de quartz revêtu d'une couche de silice est mesurée en temps réel, en enregistrant simultanément les modifications dans la fréquence de résonance, « ΔF », et dans la dissipation « ΔD », qui sont reliées à la masse adsorbée ainsi qu'aux pertes de friction de la couche adsorbée, respectivement.

25 La désorption des microparticules ou nanoparticules de la surface du support solide peut être aussi mesurée, à l'étape b2) du procédé, selon une technique classique de résonance de surface du plasma (SPR ou « surface plasmon resonance »), bien connue de l'homme du métier.

30 La désorption des microparticules ou nanoparticules de la surface du support solide peut être aussi mesurée, à l'étape b2) du procédé, par mesure des variations de la capacitance ou de la résistance électrique du dispositif, plus spécifiquement lorsque le dispositif consiste en un dispositif avec support solide semi-conducteur tel que décrit ci-dessus. Ces mesures de variations électriques sont décrites en détail notamment par Souteyrand
35 at al. (1997, J. Phys. Chem. B, Vol. 101 : 2980-2985) ainsi que dans les

brevets américains n° US 5,869,244, n° US 6,150,106, n° US 6,355,436 et n° US 6,562,577.

Comme cela a déjà été indiqué précédemment dans la description et comme cela est illustré dans les exemples, le procédé de détection selon l'invention peut être utilisé avec des composés appâts qui consistent en des acides nucléiques se fixant sur le ou les composé(s) cible(s).

Procédé de fabrication d'un dispositif de détection selon l'invention.

Le procédé ci-dessus est décrit en relation avec le mode de réalisation du dispositif pour lequel le revêtement consiste en une couche de phospholipides. Ce procédé est directement transposable à la fabrication d'un dispositif de détection pour lequel le revêtement est choisi parmi les autres revêtements indiqués dans la présente description.

Pour fabriquer un dispositif de détection selon l'invention, la première étape consiste à préparer des vésicules lipidiques avec un phospholipide ou un mélange de phospholipides ayant la composition finale en phospholipide de la couche de phospholipides du dispositif. Des vésicules lipidiques peuvent être préparées par toute technique connue de l'homme du métier. Notamment, les phospholipides peuvent être tout d'abord dissous dans du chloroforme et mélangés dans les quantités finales désirées, puis éventuellement soumises à une étape de dessiccation sous un courant d'azote, puis dans un dessiccateur sous vide. Les vésicules lipidiques sont ensuite resuspendues dans un tampon salin, puis homogénéisées. Des petites vésicules unilamellaires (SUVs pour « small unilamellar vesicles ») sont obtenues par sonication, par exemple avec un dispositif du type « tip-sonicator » (misonix, NY, USA).

Puis, les petites vésicules unilamellaires (SUVs) sont mises en contact avec le support solide de base afin de former la couche de phospholipides.

Selon un autre mode de fabrication, la couche de phospholipide est obtenue à la surface du support solide par application des petites vésicules unilamellaires de lipides préparées comme ci-dessus. Après rinçage, du support solide revêtu de la couche de phospholipide, on procède à une étape d'adsorption des microparticules ou des nanoparticules qui consistent

en une incubation du support revêtu de la couche de phospholipides avec ces microparticules ou nanoparticules, pendant une durée nécessaire à leur adsorption, avant rinçage du dispositif de détection, par exemple dans un tampon phosphate.

5 Après préparation du dispositif de détection selon l'invention, celui-ci peut être conservé au froid et sous atmosphère d'azote pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois.

 Une fois préparé, le dispositif de détection selon l'invention peut être aussi conservé plusieurs semaines, voire plusieurs mois dans un milieu
10 liquide à la température d'un réfrigérateur (4°C), de préférence un tampon phosphate conventionnel.

 La présente invention est en outre illustrée par les exemples suivants.

EXEMPLES

15

Exemple 1 : Procédé de fabrication d'un dispositif de détection selon l'invention

1.1. Préparation du support solide

Nettoyage du substrat de verre : bain de méthanol, puis bain de H₂O +
20 H₂O₂ 10%. Rincage H₂O

1.2. Revêtement du support solide par la couche de phospholipides

Fixation de la couche de phospholipides: le verre est mis à incuber au moins 10 minutes dans un tampon phosphate allant de 0.01 à 1M en
25 présence de vésicules d'EDMPC.

Un rinçage est ensuite effectué avec le tampon, en prenant la précaution d'éviter tout contact de la surface du support revêtu de la couche de phospholipides avec l'air. Le support doit être conservé dans le tampon phosphate allant de 0.1M à 1M.

30

1.3. Liaison non covalente des nanoparticules avec la couche de phospholipides

a) Préparation des acides nucléiques appâts

Les acides nucléiques thiolés utilisés sont d'origine commerciale (Eurogentec). Ils sont synthétisés par des protocoles standards de la chimie des phosphoamides, puis purifiés par chromatographie en phase inverse.

5 *b) Fixation des acides nucléiques appâts sur les nanoparticules*

Les nanoparticules d'or colloïdal et leur fonctionnalisation sont élaborées selon une procédure décrite par J. Storhoff et al., (J. Am. Chem. Soc. **120**, 1959, 1998) : une solution de HAuCl_4 et de citrate de sodium. 50 mL de HAuCl_4 à 1 mM sont chauffés sous agitation continue. Une fois l'ébullition atteinte, 5 mL de citrate de sodium à 38.8 mM sont ajoutés à la solution. La solution jaune pâle au départ devient rouge. L'ébullition et l'agitation sont maintenues pendant 15 minutes, avant de laisser la solution refroidir à température ambiante. La solution est ensuite filtrée à travers des filtres ayant des pores de 0.8 μm , puis 0.2 μm . Les particules obtenues ont un diamètre d'environ 14 nm. Pour la fonctionnalisation, nous ajoutons 18 nMole d'oligonucléotides thiolés à 5 mL de solution de nanoparticules. Après incubation pendant 16 h, la solution est portée à 0.1 M NaCl, 10 mM buffer phosphate pendant 40 h. Pour éliminer les excès d'oligonucléotides, la solution est ensuite rincée par une succession de centrifugation, d'élimination du solvant et resuspension des nanoparticules dans du buffer phosphate 0.1 M et MgCl_2 à 10^{-3} M.

25 *c) Liaison non covalente des nanoparticules sur la couche de phospholipides*

Adsorption des nanoparticules : les nanoparticules sont ajoutées au tampon qui baigne l'échantillon. Après un temps suffisant d'incubation à température ambiante (20-22°C) (qui dépend de la concentration en nanoparticules) d'une durée de 10 minutes à une nuit, l'échantillon est rincé dans du tampon phosphate 0.1 M et conservé dans celui-ci. A ce stade, l'échantillon présente une couleur rouge.

Exemple 2 : Méthodologie générale du procédé de détection selon l'invention.

Tous les essais sont réalisés avec dispositifs de détection fabriqués en utilisant, comme support solide de base, soit des parties de lamelles de verre couvre-objet pour microscopie optique, leur surface étant d'environ 30mm², soit des billes de verre de 2 mm de diamètre, qui ont été préparées comme décrit à l'Exemple 1. Les essais d'hybridation consistent à mettre en présence les dispositifs de détection avec une certaine quantité d'oligonucléotides cibles de 24 bases de longueur, respectivement :

- soit des oligonucléotides cibles de 24 bases complémentaires des séquences des acides nucléiques appâts préalablement fixés sur les nanoparticules ;
- soit des oligonucléotides de 24 bases non complémentaires des séquences des acides nucléiques appâts préalablement fixés sur les nanoparticules ;

L'étape d'hybridation est réalisée dans un volume d'environ 200µL ou 20µL de tampon phosphate 1M ou 0.3M à température ambiante (20°C-25°C). Après incubation d'une durée de 30 minutes à une nuit, un test de désorption est réalisé en ajoutant un certain volume d'une solution de KCl 2M ou NaCl 5M, ou de sulfate de dextran à 1% (Poids/Volume) sans aucun autre traitement préalable.

L'événement de désorption est observé à l'œil nu. Lors de l'événement de désorption, on observe simultanément la coloration de la solution tampon et la décoloration de l'échantillon. L'étape de désorption se réalise en seulement quelques secondes.

Nanoparticules utilisées

Nanoparticules N°1 : diamètre 14nm, fonctionnalisées par SH-(CH₂)₆5'-CGCATTTCAGCAT-3' (SEQ ID N°1)

Nanoparticules N°2 : diamètre 14nm, fonctionnalisées par 5'-TCTCAACTCGTA-3'(CH₂)₃SH (SEQ ID N°2)

30

Oligonucléotides contenus dans les échantillons à tester

Oligonucléotide Complémentaire :

5'-TACGAGTTGAGACTGCTGAATGCG-3' (SEQ ID N°8)

35 Oligonucléotide non Complémentaire :

5'-AGACATCATCATGCAAAGAATCGAC-3' (SEQ ID N°4)

Echantillons à tester

Deux types d'échantillons ont été utilisés : le premier comporte que des nanoparticules N°2, le second comporte un mélange dans un rapport 1:1 entre des nanoparticules N°1 et des nanoparticules N°2.

L'oligonucléotide complémentaire peut s'hybrider avec les nanoparticules N°2 en formant une double hélice de 12 paires de bases, les 12 autres restant libres.

L'oligonucléotide complémentaire peut s'hybrider à la fois avec les nanoparticules N°1 et les nanoparticules N°2. Ainsi, l'oligonucléotide complémentaire permet de créer des liens entre les nanoparticules N°1 et N°2 de 24 paires de bases.

Exemple 3 : Spécificité du dispositif de détection selon l'invention

Tous les essais sont réalisés avec dispositifs de détection fabriqués en utilisant, comme support solide de base, des parties de lamelles de verre couvre-objet pour microscopie optique, qui ont été préparées comme décrit à l'Exemple 1. Leur surface est d'environ 30mm².

Echantillon A: mélange 1/1 de nanoparticules N°1 et nanoparticules N°2.

- Hybridation avec 1nmoles oligonucléotide **non complémentaire** pendant 30 minutes. Tampon phosphate 1M

- Test de désorption : désorption à partir du rajout de 10µl NaCl 5M

Echantillon B: mélange 1/1 de nanoparticules 1 et nanoparticules 2.

- Hybridation avec 1pmoles oligonucléotide **complémentaire** pendant 30 minutes. Tampon phosphate 1M

- Test de désorption : pas de désorption , testé jusqu'au rajout de 160µl NaCl 5M

Conclusion : cette méthode permet de détecter des oligonucléotides de séquence spécifique.

Exemple 4 : Sensibilité du dispositif de détection de l'invention

Tous les essais sont réalisés avec dispositifs de détection fabriqués en utilisant, comme support solide de base, des parties de lamelles de verre couvre-objet pour microscopie optique, qui ont été préparées comme décrit à l'Exemple 1. Leur surface est d'environ 30mm².

5

Echantillon A: mélange 1/1 de nanoparticules 1 et nanoparticules 2.

- Hybridation avec **1pmoles** oligonucléotide complémentaire pendant 1 nuit.

Tampon phosphate 1M

- Test de désorption : rajout de 10µl KCl 2M : pas de désorption.

10

Echantillon B: mélange 1/1 de nanoparticules 1 et nanoparticules 2.

- Hybridation avec **100fmoles** oligonucléotide complémentaire pendant 1 nuit. Tampon phosphate 1M

- Test de désorption : rajout de 10µl KCl 2M : pas de désorption

15

Echantillon C: mélange 1/1 de nanoparticules 1 et nanoparticules 2.

- Hybridation avec **10fmoles** oligonucléotide complémentaire pendant 1 nuit. Tampon phosphate 1M

- Test de désorption : rajout de 6µl KCl 2M : pas de désorption, + 4µl KCl 2M : désorption.

20

Echantillon D: mélange 1/1 de nanoparticules 1 et nanoparticules 2.

- Incubation **sans oligonucléotides** pendant 1 nuit . Tampon phosphate 1M

25

- Test de désorption : rajout de 6µl KCl 2M : désorption.

Conclusion : nous avons été capables de détecter facilement 100fM voire 10fmoles d'oligonucléotides.

30

Exemple 5 : Adaptation des paramètres de température du procédé de détection de l'invention

Dans cet exemple, et pour un dispositif de détection de l'invention comprenant des acides nucléiques appâts préparé comme décrit à l'exemple 1, on montre que la température de désorption de l'ensemble phospholipides/nanoparticules dépend de la température de fusion du

35

complexe hybride formé entre l'acide nucléique appât et l'acide nucléique cible.

Echantillon A: mélange 1/1 nanoparticules 1 et nanoparticules 2

- 5 - Hybridation avec 1nM oligonucléotide complémentaire pendant 1h30.
 Tampon phosphate 1M
 - Test de désorption : rajout de 60µl NaCl 5M : pas de désorption.
 - *Température de fusion dans tampon final >> Tm théorique à 50mM NaCl :
 Tm%GC : 52.6°C, Tm(2AT+4GC) : 70°C*
 10 **Chauffage : désorption vers 65°C**

Echantillon B: nanoparticules 2 (Tm dans 1M phosphate+ >Tm théorique à 50mM NaCl :)

- 15 - Hybridation avec 1nM oligonucléotide complémentaire pendant 1h30.
 Tampon phosphate 1M
 - Test de désorption : rajout de 560µl NaCl 5M : pas de désorption
 - *Température de fusion dans tampon final >> Tm théorique à 50mM NaCl :
 Tm %GC : 28.6 °C, Tm(2AT+4GC) : 34°C*
Chauffage : désorption avant 45°C

20

Conclusion : les températures de désorption dépendent de la température de melting.

Exemple 6 : Tests de diverses conditions de désorption des nanoparticules

- 25 Tous les essais sont réalisés avec dispositifs de détection fabriqués en utilisant, comme support solide de base, des parties de lamelles de verre couvre-objet pour microscopie optique, qui ont été préparées comme décrit à l'Exemple 1. Leur surface est d'environ 30mm².

30 **Echantillon A:** nanoparticules 1

- Hybridation avec 1nM oligonucléotide complémentaire pendant 1 heure.
 Tampon phosphate **1M**
 - Test de désorption : pas de désorption, testé jusqu'au rajout de 1ml KCl 2M

35

Echantillon A': nanoparticules 1.

- Incubation sans oligonucléotides pendant 1 heure. Tampon phosphate **1M**
- Test de désorption : rajout de 150µl KCl 2M : désorption

5 **Echantillon B**: nanoparticules 1

- Hybridation avec 1nM oligonucléotide complémentaire pendant 1 heure. Tampon phosphate **0.1M**
- Test de désorption : pas de désorption, testé jusqu'au rajout de 1ml KCl 2M

10

Echantillon B': nanoparticules 1.

- Incubation sans oligonucléotides pendant 1 heure. Tampon phosphate **0.1M**
- Test de désorption : rajout de 150µl KCl 2M : désorption

15

Conclusion : La méthode peut être employée dans une large gamme de concentrations en sel.

Exemple 7 : Tests de diverses conditions de désorption des nanoparticules.

20

Tous les essais sont réalisés avec dispositifs de détection fabriqués en utilisant, comme support solide de base, des parties de lamelles de verre couvre-objet pour microscopie optique, qui ont été préparées comme décrit à l'Exemple 1. Leur surface est d'environ 30mm².

25

Echantillon A: mélange 1/1 nanoparticules 1 et nanoparticules 2

- Hybridation avec 1pM oligonucléotide complémentaire pendant 1h30. Tampon phosphate 0.2M
- Test de désorption : rajout de 200µl d'une solution de Dextran sulfate à 1%: pas de désorption

30

Echantillon A': mélange 1/1 nanoparticules 1 et nanoparticules 2

- Hybridation avec 1pM oligonucléotide complémentaire pendant 1h30. Tampon phosphate 0.2M
- Test de désorption : rajout de 50µl d'une solution KCl 2M : pas de désorption

35

Echantillon B: mélange 1/1 nanoparticules 1 et nanoparticules 2

- Hybridation avec 1nM oligonucléotide non complémentaire pendant 1h30. Tampon phosphate 0.2M
- Test de désorption : rajout de 200µl d'une solution de Dextran sulfate à 1%: désorption

5

Echantillon B': mélange 1/1 nanoparticules 1 et nanoparticules 2

- Hybridation avec 1nM oligonucléotide non complémentaire pendant 1h30. Tampon phosphate 0.2M
- Test de désorption : rajout de 50µl d'une solution de solution KCl 2M : désorption

10

Conclusion : La désorption peut être provoquer par différents moyens, comme l'addition de macromolécules telles que le Dextran sulfate.

Exemple 8 : Système de détection comprenant une pluralité de dispositifs microparticulaires de détection de l'invention.

15

Le dispositif est un mélange d'environ un pour un (1 :1) de deux types de microparticules pour un poids total d'environ 0,2mg:

Microparticules A :

20

microparticules sphériques formant un complexe avec la séquence 5'-CGAAAGTCTGAC-3' (SEQ ID N°5) d'un ADN cible.

caractéristique d'identification : diamètre de 10-30 µm

Microparticules B :

25

microparticules sphériques formant un complexe avec la séquence

5'-ATGCTGAATGCG-3' (SEQ ID N°6) d'un autre ADN cible.

caractéristique d'identification : diamètre de 50-100 µm

La fabrication des microparticules et le procédé de détection sont décrit dans les exemples précédents.

30

Ces microparticules de verre ont la caractéristique de perdre leur coloration rouge au cours du procédé de détection si des complexes ne se sont pas formés à leur surface. Les microparticules restant rouges indiquant la présence du complexe cible. Ainsi après cette étape, un étalement des microparticules sur une lame de microscope et une observation des

particules sous un microscope permet d'observer et à la fois la taille de la microparticule et si un complexe s'est formé (coloration rouge ou pas) indiquant la présence des composés cibles.

5 Expérience 1

Les microparticules sont dispersés dans 20µl de tampon phosphate 0.1M PH:7 contenant 20pM d'oligonucléotide de séquence 5'-TACGAGTTGAGAATGCTGAATGCG-3' (SEQ ID N°1) qui peut former un complexe avec les microparticules de type B, mais pas avec les
10 microparticules A. Le tout est incubé pendant 45 minutes à température ambiante(25°C) et la détection est effectuée.

Observation microscopique : seules les particules de diamètre 50-100µm sont rouges, les particules de diamètre 10-30 sont non colorées.

15 Expérience 2

Les microparticules sont dispersés dans 20µl de tampon phosphate 0.1M PH:7 contenant 20pM d'oligonucléotide de séquence 5'-CGAAAGTCTGACAGTCCTAATGAG-3' (SEQ ID N° 7) qui peut former un complexe avec les microparticules de type A, mais pas avec les
20 microparticules B. Le tout est incubé pendant 45 minutes à température ambiante(25°C) et la détection est effectuée.

Observation microscopique : seules les particules de diamètre 10-30µm sont rouges, les particules de diamètre 50-100µm sont non colorées.

25 Expérience 3

Les microparticules sont dispersés dans 20µl de tampon phosphate 0.1M PH:7 contenant 20pM d'oligonucléotide de séquence 5'-CGAAAGTCTGACAGTCCTAATGAG-3' (SEQ ID N°7) qui peut former un complexe avec les microparticules de type A, mais pas avec les
30 microparticules B et 20pM d'oligonucléotide de séquence

5'-TACGAGTTGAGAATGCTGAATGCG-3' (SEQ ID N°3) qui peut former un complexe avec les microparticules de type B , mais pas avec les microparticules A. Le tout est incubé pendant 45 minutes à température ambiante (25°C) et la détection est effectuée.

- 5 Observation microscopique : les particules de diamètre 10-30µm et, les particules de diamètre 50-100µm sont rouges.

Exemple 9 : Test de désorption des nanoparticules avec le sulfate de dextran.

- 10 Tous les essais sont réalisés avec dispositifs de détection fabriqués en utilisant, comme support solide de base, des billes de verres de 2 mm de diamètre, qui ont été préparées comme décrit à l'Exemple 1.

- 15 - nanoparticules 1 fonctionnalisées par TCCATTGCGGAA-3'(CH₂)₃SH [SEQ ID N°9]

- nanoarticules 2 fonctionnalisées par SH-(CH₂)₆5'GTCAGACTTTTCG [SEQ ID N°10]

- 20 - oligo complémentaire 1 :TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC [SEQ ID N°11]

- oligo complémentaire 2 :TTCCGCAATGGA(A)₃₀CGAAAGTCTGAC [SEQ ID N°12]

Expérience A :

- 25 - Echantillon avec des nanoparticules1
 - Hybridation 1heure à Température du laboratoire avec 100 pmoles oligo complémentaire 1 dans 20 µl de tampon sodium 0.3M.
 - Test de désorption : ajout de 10 µl de sulfate de Dextran à 1%

- 30 Résultats : Les nanoparticules désorbent complètement du support de microbilles.

Expérience B :

- Echantillon avec des nanoparticules¹ et nanoparticules 2 dans une égale proportion.
- Hybridation 1heure à T ambiant avec 100 pmoles oligo complémentaire 1 dans 20µl Na buffer 0.3M.
- 5 - Test de désorption : ajout de 10µl de Dextran sulfate à 1%

Résultats : Les nanoparticules ne désorbent pas du tout.

Expérience C :

- 10 - Echantillon avec des nanoparticules¹ et nanoparticules 2 dans une égale proportion.
- Hybridation 1heure à T ambiant avec 100 pmoles oligo complémentaire 2 dans 20µl Na buffer 0.3M.
- Test de désorption : ajout de 10µl de Dextran sulfate à 1%

15

Résultats : Les nano-particules ne désorbent pas du tout.

- La figure 3 illustre les résultats des mesures d'absorption à 527 nm (absorption des nanoparticules) de la solution après hybridation d'un
- 20 échantillon avec différentes quantités d'oligonucléotides complémentaires, puis ajout de sulfate de Dextran.

Exemple 10 : Détection de mismatch

- Les échantillons consistent en des cuves en polystyrène pour
- 25 spectrophotométrie. Le fond de ces cuves ont été revêtues des phospholipides et de nanoparticules de 2 types par les mêmes procédures que la préparation sur support de verre décrite à l'exemple 1:

Fabrication du dispositif de détection

- 30 Nanoparticules 1 SH-(CH₂)₆5'-TTT-TTT-TTT-TTA-ATT-ACG-TGA-3' [SEQ ID N°13]
- Nanoparticules 2 5'-ATT-AAT-TAT-CGA-TTT-TTT-TTT-TT-3'(CH₂)₃SH 3' [SEQ ID N°14]

Ces cuves sont ensuite hybridées dans 50µl buffer phosphate 0.3M avec 80 pmol d'oligonucléotides :

Cuve « sm » : un complémentaire T-TAA-TGC-ACT-TAA-TTA-ATA-GCT [SEQ ID N°15]

5 Cuve « 1m » : un oligo présentant 1 mismatch : T- TAA-TGC-ACT-CAA-TTA-ATA-GCT [SEQ ID N°16]

Cuve « 3m » : un oligo présentant 3 mismatch T-TAA-TCG-ACT-CAA-CCA-ATA-GCT [SEQ ID N°17]

10 Procédure :

Après 30 minutes d'incubation à T ambiante, 1ml d'une solution de Dextran sulfate à 1% sont ajoutés. Les cuves sont ensuite placée dans un spectromètre thermostaté et l'absorption à 527nm est suivie en fonction de la température. « Une courbe de Tm » peut être ainsi réalisée comme on

15 peut le voir sur la figure 4:

Résultats :

La figure 4 illustre les résultats de désorption des nanoparticules après incubation avec les différentes séquences cibles induisant des complexes d'hybridation sans mésappariement (sm) un mésappariement (1m) ou trois

20 mésappariements (3m).

Sur les courbes de la figure 3, on peut voir notamment qu'à la température de 40°C un échantillon hybridé avec un mésappariement est complètement désorbé alors que l'échantillon qui est hybridé sans mésappariement n'est

25 pas désorbé.

Ces résultats illustrent la grande spécificité de détection qui peut être obtenue avec un dispositif de détection selon l'invention. Une détection de SNP est réalisable.

30

REVENDICATIONS

1. Dispositif pour détecter la fixation d'un composé cible sur un composé appât immobilisé sur un support, ledit dispositif comprenant :
 - 5 a) un support solide ;
 - b) un revêtement lié de manière non covalente à la surface dudit support solide ; et
 - c) une pluralité de microparticules ou de nanoparticules sur chacune desquelles est fixé au moins un composé appât, lesdites microparticules
 - 10 ou nanoparticules étant liées au revêtement.
2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que le support solide consiste en un support solide dont la surface en contact avec le revêtement est chargée négativement ou positivement dans une solution tampon **ou**
15 consiste en un support solide hydrophobe.
3. Dispositif selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que le support solide est choisi parmi le verre minéral, la silice, le silicium, le mica, une alumine, le quartz, un oxyde métallique, un polymère organique chargé
20 négativement et un polymère hydrophobe.
4. Dispositif selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'oxyde métallique est choisi parmi ZnO, TiO₂, Fe₂O₃ et V₂O₅
- 25 5. Dispositif selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que le polymère organique est choisi parmi les polymères suivants : polyéthylène, polypropylène, polybutadiène, polyoxyéthylène, polystyrène, polycarbonate, et polyméthacrylate.
- 30 6. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le revêtement consiste en une couche comprenant des molécules amphiphiles.

7. Dispositif selon la revendication 6, caractérisé en ce que les molécules amphiphiles sont choisies parmi les lipides, les agents tensio-actifs et les polymères organiques amphiphiles.
- 5 8. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la surface de la couche de revêtement sur laquelle sont liées les microparticules ou les nanoparticules est chargée positivement dans une solution tampon.
- 10 9. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la couche de revêtement consiste en une couche de phospholipides comprenant au moins un type de phospholipides choisi parmi le 1,2-dilauroyl-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine, 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine (EDMPC), 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine, 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine et 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine.
- 15 10. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la couche de revêtement consiste en une couche de phospholipides comprenant au moins un type de phospholipides choisi parmi le DPPG, le DMPG, le DPG, le PS, le PI, le PG, le DOPS, le DOPA, le POPA, le DOPG et le POPG.
- 20 11. Dispositif selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce que la couche de phospholipides comprend au moins un type de phospholipides choisi parmi le DMPC, le DOPC et le DPPC,
- 25 12. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la surface extérieure des microparticules ou les nanoparticules est constituée d'un matériau métallique, d'un matériau semi-conducteur ou d'un matériau isolant.
- 30

13. Dispositif selon la revendication 12, caractérisé en ce que le matériau métallique est choisi parmi Au, Ag, Cu et Co.
14. Dispositif selon la revendication 12, caractérisé en ce que le matériau
5 semi-conducteur est choisi parmi Si, Ge, ZnO, SnO, CdS, CdSe et GaAs.
15. Dispositif selon la revendication 12, caractérisé en ce que le matériau isolant est choisi parmi le verre, SiO_2 , Fe_2O_3 , le latex et un polymère isolant.
10
16. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que le(s) composé(s) appât(s) est (sont) lié(s) de manière covalente aux microparticules ou aux nanoparticules.
- 15 17. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'au moins deux composés appâts distincts sont liés à une microparticule ou une nanoparticule.
18. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que
20 le(s) composé(s) appât(s) est(sont) une protéine ou un peptide.
19. Dispositif selon la revendication 18, caractérisé en ce que le(s) composé(s) appât(s) est(sont) choisi(s) parmi les récepteurs de facteurs de croissance, les récepteurs d'hormones, les récepteurs des
25 neurotransmetteurs, les récepteurs de cytokines, les récepteurs de la matrice extracellulaire, les lectines, les cytokines, les serpins, les facteurs de transcription, les protéines se liant à l'ADN, les protéines à doigt de zinc, les antigènes de surface cellulaires et les antigènes.
- 30 20. Dispositif selon la revendication 18, caractérisé en ce que le(s) composé(s) appât(s) est(sont) un(des) anticorps.
21. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que le(s) composé(s) appât(s) est(sont) un(des) acide(s) nucléique(s).
35

22. Dispositif selon la revendication 21, caractérisé en ce que l'acide nucléique appât comprend une séquence se liant spécifiquement à un composé cible.
- 5 23. Dispositif selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'acide nucléique appât comprend au moins une séquence s'hybridant avec un acide nucléique cible.
- 10 24. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 23, caractérisé en ce qu'il comprend des nanoparticules d'or sur lesquelles sont fixés de manière covalente des acides nucléiques appâts s'hybridant avec le ou les composé(s) cible(s).
- 15 25. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 24, caractérisé en ce que les microparticules ou les nanoparticules contiennent une molécule détectable par colorimétrie ou fluorimétrie.
- 20 26. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 24, caractérisé en ce que le revêtement contient des molécules détectables par colorimétrie ou fluorimétrie.
- 25 27. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 26, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 100 microparticules ou nanoparticules.
28. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 27, caractérisé en ce que le support possède une surface plane.
29. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 27, caractérisé en ce que le support est sphérique.
- 30 30. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 27, caractérisé en ce que le support consiste en une microparticule dont la plus grande dimension varie de 500 nanomètres à 2 millimètres.

31. Dispositif selon la revendication 30, caractérisé en ce que la microparticule support, ou le revêtement, comprend un composé fluorochrome ou une combinaison de composés fluorochromes.
- 5 32. Système de détection de la fixation d'au moins un composé cible sur un composé appât, caractérisé en ce qu'il comprend une pluralité de dispositifs de détection selon l'une des revendications 1 à 31.
- 10 33. Système de détection selon la revendication 32, caractérisé en ce que les dispositifs de détection contenus dans celui-ci consistent en des dispositifs microparticulaires de détection.
- 15 34. Système de détection selon l'une des revendication 32 ou 33, caractérisé en ce que chaque dispositif de détection comprenant un composé appât déterminé se distingue de chacun des autres dispositifs de détection par au moins un paramètre physique telle que la forme, la taille, la couleur ou les propriétés de fluorescence.
- 20 35. Procédé pour détecter la fixation d'un composé cible sur un composé appât, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 25 a) mettre en contact un échantillon susceptible de contenir ledit composé cible avec un dispositif selon l'une des revendications 1 à 31, ou avec un système de détection selon l'une des revendications 32 à 34, ledit dispositif ou ledit système comprenant au moins un composé appât se fixant sur ledit composé cible;
- b) détecter les complexes éventuellement formés entre ledit composé cible et ledit composé appât.
- 30 36. Procédé selon la revendication 35, caractérisé en ce que l'étape b), comprend les sous-étapes suivantes :
- 35 b1) on soumet le dispositif ou le système à des conditions d'environnement dans lesquelles les microparticules ou les nanoparticules sont désorbées de la surface du support solide du ou des dispositif(s), en l'absence de formation de complexes entre le(s) composé(s) appât(s) et le(s) composé(s) cible(s) ;

b2) on détecte la désorption des microparticules ou des nanoparticules à partir de la surface du support solide.

37. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce qu'à l'étape b1) le
5 dispositif est immergé dans une solution saline concentrée.

38. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'à l'étape b1), le
dispositif est immergé dans une solution de NaCl ayant une concentration
finale d'au moins 0,5 M, de préférence une concentration finale allant de 0,5
10 M à 2 M, la concentration finale étant de manière tout à fait préférée de 1
M.

39. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'à l'étape b1), le
dispositif est immergé dans une solution de KCl ayant une concentration
15 finale d'au moins 0,2 M, de préférence une concentration finale allant de 0,2
M à 1 M, la concentration finale étant de manière tout à fait préférée de 0,4
M.

40. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'à l'étape b1) le
20 dispositif est immergé dans une solution comprenant des macromolécules
ayant une charge nette de même polarité que la charge nette que les
microparticules ou les nanoparticules sur lesquelles est (sont) fixé(s) le(s)
composé(s) appât(s).

25 41. Procédé selon la revendication 40, caractérisé en ce qu'à l'étape b1) le
dispositif est immergé dans une solution comprenant du sulfate de dextran.

42. Procédé selon la revendication 41, caractérisé en ce qu'à l'étape b1) le
dispositif est immergé dans une solution de sulfate de dextran à une
30 concentration finale allant de 0,1 % à 5 % en poids par rapport au volume
total de la solution.

43. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce qu'à l'étape b2), la
désorption est détectée par un changement de couleur de la surface du
35 dispositif.

44. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce qu'à l'étape b2), la désorption est détectée par une modification de la valeur d'une onde acoustique traversant le support solide du dispositif.

5

45. Procédé selon la revendication 44, caractérisé en ce que la modification de la valeur d'une onde acoustique consiste en une modification de la fréquence de ladite onde acoustique.

10

46. Procédé selon la revendication 44, caractérisé en ce qu'à l'étape b2) la désorption est détectée par fluorescence.

47. Procédé selon la revendication 44, caractérisé en ce que l'étape b) est réalisée selon la technique QCM-D.

15

48. Procédé selon la revendication 35, caractérisé en ce que le(s)dit(s) composé(s) appât(s) consiste(nt) en un (des) acide(s) nucléique(s) se fixant sur ledit composé cible.

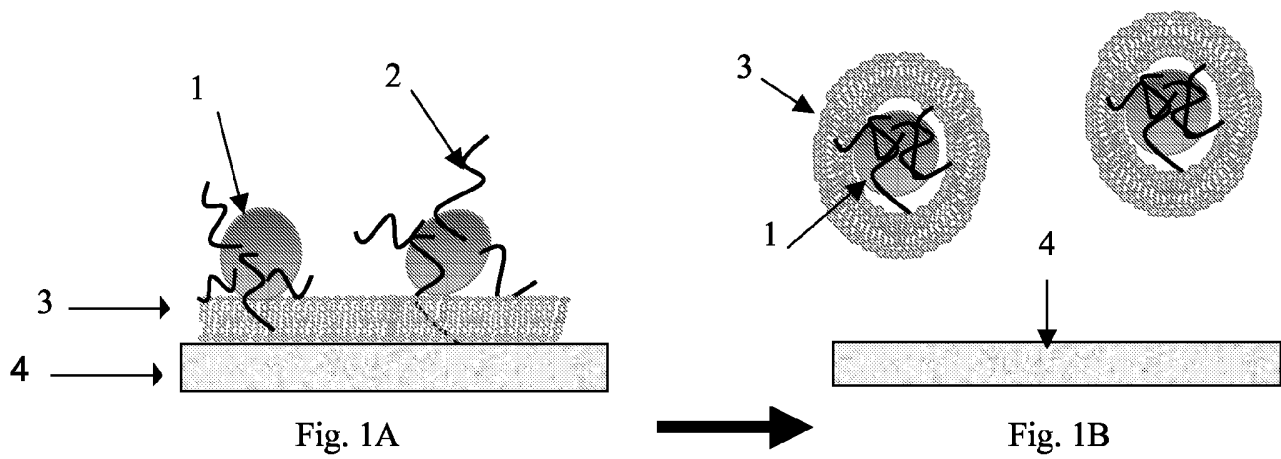


Figure 1

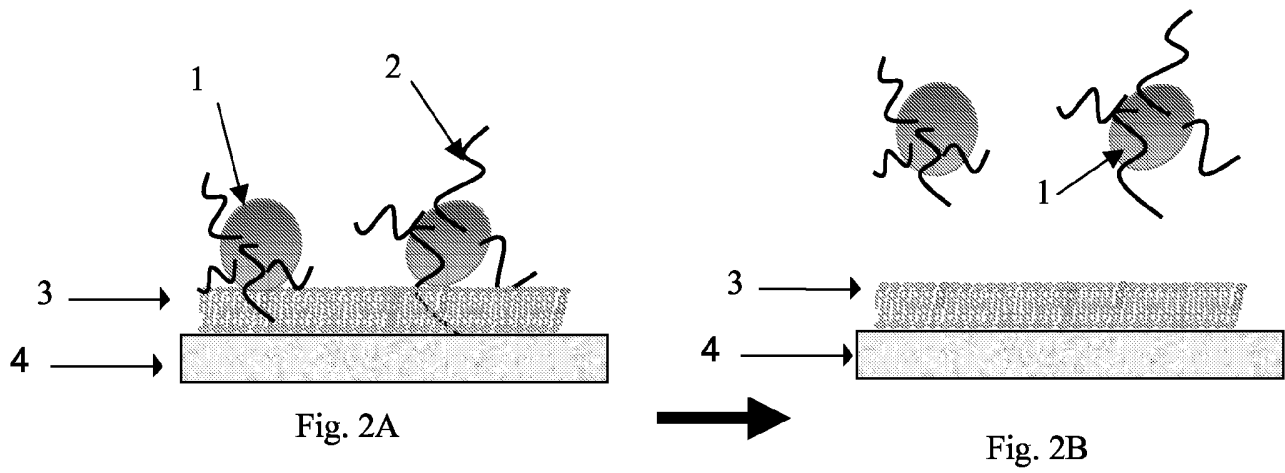


Figure 2

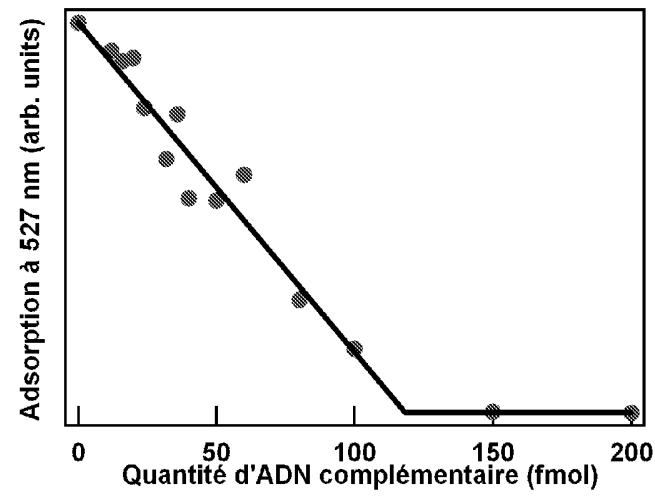


Figure 3

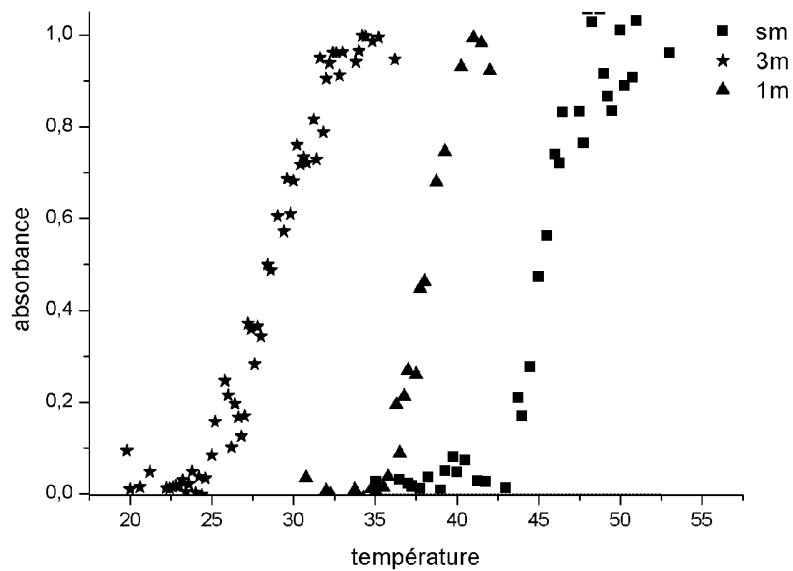


Figure 4

SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

<120> Dispositif pour détecter la fixation d'un composé cible sur un composé appât immobilisé sur un support et procédé de détection

<130> R315-PCT

<150> FR 04/51747

<151> 2004-07-30

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 12

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> séquence d'hybridation

<220>

<221> mutation

<222> (1)..(1)

<223> modification par groupe alkylthio

<400> 1

cgcattcagc at 12

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> séquence d'hybridation

<220>

<221> mutation

<222> (12)..(12)

<223> modification par groupe alkylthio

<400> 2

tctcaactcg ta 12

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> séquence d'hybridation

<400> 3

tacgagttga gaatgctgaa tgcg 24

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence d'hybridation

<400> 4
agacatcatc atgcaaagaa tcgac 25

<210> 5
<211> 12
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence d'hybridation

<400> 5
cgaaagtctg ac 12

<210> 6
<211> 12
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence d'hybridation

<400> 6
atgctgaatg cg 12

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence d'hybridation

<400> 7
cgaaagtctg acagtcctaa tgag 24

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence d'hybridation

<400> 8
tacgagttga gactgctgaa tgcg 24

<210> 9
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> séquence d'hybridation

<220>
 <221> mutation
 <222> (12)..(12)
 <223> modification par groupe alkylthio

<400> 9
 tccattgcgg aa 12

<210> 10
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> séquence d'hybridation

<220>
 <221> mutation
 <222> (1)..(1)
 <223> modification par groupe alkylthio

<400> 10
 gtcagacttt cg 12

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> séquence d'hybridation

<400> 11
 ttccgcaatg gacgaaagtc tgac 24

<210> 12
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> séquence d'hybridation

<400> 12
 ttccgcaatg gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aacgaaagtc tgac 54

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence d'hybridation

<220>
<221> mutation
<222> (1)..(1)
<223> modification par groupe alkylthio

<400> 13
tttttttttt taattacgtg a 21

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence d'hybridation

<220>
<221> mutation
<222> (23)..(23)
<223> modification par groupe alkylthio

<400> 14
attaattatc gatttttttt ttt 23

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence d'hybridation

<400> 15
ttaatgcact taattaatag ct 22

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence d'hybridation

<400> 16
ttaatgcact caattaatag ct 22

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence d'hybridation

<400> 17
ttaatcgact caaccaatag ct

22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/050629

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/543 C12Q1/68

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 C12Q

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, 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 00/33078 A (SYNTRIX BIOCHIP INC ; ZEBALA JOHN A (US)) 8 June 2000 (2000-06-08)	1-3,5, 12,15, 16, 18-23, 25-29, 32-35
Y	the whole document	6-11,13, 14,17-24
X	US 2003/017464 A1 (POHL CHRISTOPHER A) 23 January 2003 (2003-01-23)	1-5,12, 15,16, 18-23, 25-28, 30-35
Y	the whole document	6-11,13, 14,17-24
	----- -/--	

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

☒ Patent family members are listed in 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

6 December 2005

Date of mailing of the international search report

16/12/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Diez Schlereth, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/050629

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/004993 A (MILLIPORE CORP) 16 January 2003 (2003-01-16) the whole document	1-3,5, 12,15, 16,18,21
Y	YE JIAN-SHAN ET AL: "Nanostructured platinum-lipid bilayer composite as biosensor." BIOELECTROCHEMISTRY (AMSTERDAM, NETHERLANDS) APR 2003, vol. 59, no. 1-2, April 2003 (2003-04), pages 65-72, XP002311947 ISSN: 1567-5394 the whole document	6-11,13, 14,17,24
A	US 2002/123155 A1 (HIMMELHAUS MICHAEL ET AL) 5 September 2002 (2002-09-05) the whole document	1-48
A	J. PARK ET AL: "Evaluation of 2-methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine polymeric nanoparticle for immunoassay of C-reactive protein detection" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 76, 2004, - 1 May 2004 (2004-05-01) pages 2649-2655, XP002311948 the whole document	1-48
A	SIGUIER J P ET AL: "Development of a new method to characterize (SMBVTM) antigen formulations using surface plasmon resonance technology" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS (KIDLINGTON), vol. 242, no. 1-2, 21 August 2002 (2002-08-21), pages 411-415, XP002311949 ISSN: 0378-5173 the whole document	1-48
A	MANDAL S ET AL: "Patterned silver nanoparticle films by an ion complexation process in thermally evaporated fatty acid films" MATERIALS RESEARCH BULLETIN, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, NEW YORK, US, vol. 37, no. 9, 8 August 2002 (2002-08-08), pages 1613-1621, XP004372478 ISSN: 0025-5408 the whole document	1-48
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/050629

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VIKHOLM I ET AL: "Highly efficient immobilisation of antibody fragments to functionalised lipid monolayers" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1421, no. 1, 21 September 1999 (1999-09-21), pages 39-52, XP004273045 ISSN: 0005-2736 the whole document -----	1-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/050629

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0033078	A	08-06-2000	AU 1745200 A EP 1163520 A1 JP 2002531829 T US 6951682 B1	19-06-2000 19-12-2001 24-09-2002 04-10-2005
US 2003017464	A1	23-01-2003	NONE	
WO 03004993	A	16-01-2003	EP 1421209 A2	26-05-2004
US 2002123155	A1	05-09-2002	EP 1239286 A2 JP 2002253232 A	11-09-2002 10-09-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2005/050629

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
G01N33/543 C12Q1/68

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)
G01N C12Q

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 réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 00/33078 A (SYNTRIX BIOCHIP INC ; ZEBALA JOHN A (US)) 8 juin 2000 (2000-06-08)	1-3, 5, 12, 15, 16, 18-23, 25-29, 32-35
Y	le document en entier	6-11, 13, 14, 17-24
X	US 2003/017464 A1 (POHL CHRISTOPHER A) 23 janvier 2003 (2003-01-23)	1-5, 12, 15, 16, 18-23, 25-28, 30-35
Y	le document en entier	6-11, 13, 14, 17-24

☒ 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

6 décembre 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/12/2005

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, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Diez Schlereth, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2005/050629

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 03/004993 A (MILLIPORE CORP) 16 janvier 2003 (2003-01-16) le document en entier	1-3,5, 12,15, 16,18,21
Y	YE JIAN-SHAN ET AL: "Nanostructured platinum-lipid bilayer composite as biosensor." BIOELECTROCHEMISTRY (AMSTERDAM, NETHERLANDS) APR 2003, vol. 59, no. 1-2, avril 2003 (2003-04), pages 65-72, XP002311947 ISSN: 1567-5394 le document en entier	6-11,13, 14,17,24
A	US 2002/123155 A1 (HIMMELHAUS MICHAEL ET AL) 5 septembre 2002 (2002-09-05) le document en entier	1-48
A	J. PARK ET AL: "Evaluation of 2-methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine polymeric nanoparticle for immunoassay of C-reactive protein detection" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 76, 2004, - 1 mai 2004 (2004-05-01) pages 2649-2655, XP002311948 le document en entier	1-48
A	SIGUIER J P ET AL: "Development of a new method to characterize (SMBVTM) antigen formulations using surface plasmon resonance technology" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS (KIDLINGTON), vol. 242, no. 1-2, 21 août 2002 (2002-08-21), pages 411-415, XP002311949 ISSN: 0378-5173 le document en entier	1-48
A	MANDAL S ET AL: "Patterned silver nanoparticle films by an ion complexation process in thermally evaporated fatty acid films" MATERIALS RESEARCH BULLETIN, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, NEW YORK, US, vol. 37, no. 9, 8 août 2002 (2002-08-08), pages 1613-1621, XP004372478 ISSN: 0025-5408 le document en entier	1-48
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2005/050629

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	VIKHOLM I ET AL: "Highly efficient immobilisation of antibody fragments to functionalised lipid monolayers" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1421, no. 1, 21 septembre 1999 (1999-09-21), pages 39-52, XP004273045 ISSN: 0005-2736 le document en entier -----	1-48

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2005/050629

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0033078	A	08-06-2000	AU 1745200 A EP 1163520 A1 JP 2002531829 T US 6951682 B1	19-06-2000 19-12-2001 24-09-2002 04-10-2005
US 2003017464	A1	23-01-2003	AUCUN	
WO 03004993	A	16-01-2003	EP 1421209 A2	26-05-2004
US 2002123155	A1	05-09-2002	EP 1239286 A2 JP 2002253232 A	11-09-2002 10-09-2002