

(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
12 avril 2018 (12.04.2018)



(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/065741 A2

(51) Classification internationale des brevets :
Non classée

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2017/052748

(22) Date de dépôt international :
06 octobre 2017 (06.10.2017)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1659705 07 octobre 2016 (07.10.2016) FR

(71) Déposant : COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE
ATOMIQUE ET AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES

(CEA) [FR/FR] ; Bâtiment Le Ponant D, 25 rue Leblanc,
75015 Paris (FR).

(72) Inventeurs : MALLOGGI, Florent ; 6 rue du Lunain,
75014 Paris (FR). MESBAH, Kiarach ; 333 rue de Vaugi-
rard, 75015 Paris (FR). BREGANT, Sarah ; 24 bis rue des
Plantes, 75014 Paris (FR).

(74) Mandataire : ICOSA ; 83 avenue Denfert-Rochereau,
75014 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR,
KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

(54) Title: METHOD FOR CONCENTRATING ANALYTES

(54) Titre : PROCÉDÉ DE CONCENTRATION D'ANALYTES

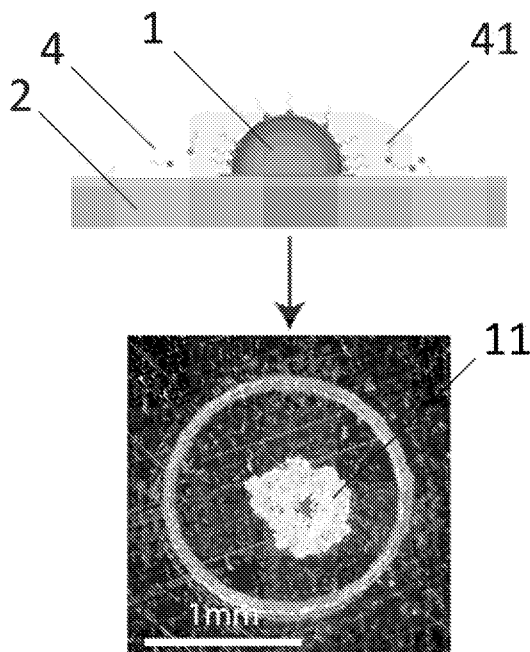


FIG. 8

(57) Abstract: The present invention relates to a method for concentrating at least one analyte (11), comprising the following steps: preparing a first phase (1) containing at least one analyte (11); depositing a drop of said first phase (1) onto a substrate (2); depositing a drop of a second, liquid phase (4) containing at least one surface-active agent (41) on the drop of first phase (1), said second phase (4) being immiscible with the first phase (1); evaporating the drop of second phase (4); and evaporating the drop of first phase (1). The invention also relates to a method for detecting at least one analyte (11) by means of this method of concentration; and to a system implementing said method of detection.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de concentration d'au moins un analyte (11) comprenant les étapes suivantes : préparation d'une première phase (1) comprenant au moins un analyte (11); dépôt d'une goutte de ladite première phase (1) sur un substrat

MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17(iv))*

Publiée:

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2(g))*

(2); dépôt sur ladite goutte de première phase (1) d'une goutte d'une seconde phase (4) liquide comprenant au moins un tensioactif (41), ladite seconde phase (4) étant non miscible avec ladite première phase (1); évaporation de la goutte de la seconde phase (4); et évaporation de la goutte de la première phase (1). La présente invention concerne également un procédé de détection d'au moins un analyte (11) mettant en œuvre ledit procédé de concentration; et un système mettant en œuvre ledit procédé de détection.

PROCÉDÉ DE CONCENTRATION D'ANALYTES

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne les domaines de la biologie et du diagnostic. En
5 particulier, la présente invention concerne un procédé de concentration d'analytes.

ÉTAT DE LA TECHNIQUE

La majorité des techniques d'analyse utilisées pour la détection d'analytes en solution
consiste à déposer une goutte de faible volume d'une solution contenant des analytes sur
10 un substrat adéquat à la technique d'analyse souhaitée. L'évaporation de la goutte
entraîne une répartition des analytes sur toute la surface de contact entre la goutte et le
substrat, menant à ce que l'on appelle communément « l'effet tâche de café ». En effet,
lors de l'évaporation de la goutte, des écoulements se produisent spontanément du fait
d'une évaporation non uniforme le long de l'interface. « L'effet tâche de café » est un
15 phénomène physique qui se produit lorsqu'une suspension colloïdale s'évapore sur un
substrat solide (Deegan et al., Nature, 1997, 389, 827-829) : le matériau en suspension
est déposé préférentiellement au niveau de la ligne de contact entre la goutte et le substrat
formant ainsi un anneau de dépôt. Dans le cas de solutions d'analytes peu concentrées,
leurs détections et leurs identifications sont rendues difficiles par cette répartition des
20 analytes au niveau de la ligne de contact entre la goutte et le substrat et sont alors limitées
par la sensibilité des outils analytiques. De plus, pour une analyse efficace et de haute
qualité, les dépôts doivent être homogènes et reproductibles d'une goutte à l'autre.

Il est connu d'avoir recours à une méthode d'électromouillage afin d'inhiber
« l'effet tâche de café » en empêchant l'ancrage de la ligne de contact de la goutte sur le
25 substrat. Par exemple, le document EP 2388568 décrit un dispositif de traitement de
gouttes composé d'un substrat comprenant deux électrodes interdigitales embarquées
dans ledit substrat. Lors de l'application d'un courant alternatif, la ligne de contact entre
la goutte et le substrat est maintenue en mouvement. Au cours du séchage de la goutte,

l'analyte ne peut donc pas se répartir sur la ligne de contact et se concentre. Cependant, ce type de dispositif est complexe et nécessite l'utilisation d'un substrat particulier équipé d'électrodes.

Il est également connu de l'homme du métier que « l'effet tâche de café » disparaît lorsque des écoulements de Marangoni sont produits dans la goutte (Deegan et al., Physical Review E, 2000, 61, 475-485). Ces écoulements interviennent dès lors qu'il y a un gradient de tension de surface le long de l'interface de la goutte, le fluide s'écoule alors depuis les régions de plus faible tension de surface vers les régions de plus grande tension de surface. Les recirculations alors engendrées par les écoulements de Marangoni au sein de la goutte permettent de concentrer des espèces de toutes natures et de toutes tailles (cristaux, biomolécules, peptides, protéines, nanoparticules ou microparticules) présentes dans l'échantillon. Ces écoulements peuvent être activés par différents mécanismes, notamment par effet thermocapillaire, c'est-à-dire l'application d'un gradient de température qui entraîne un gradient de tension de surface. Il est connu que pour des substrats de très faible conductivité thermique les écoulements de Marangoni se font depuis la ligne de contact vers le centre de la goutte. Le document US 2015/0118696 décrit un dispositif diagnostique mettant en œuvre ce mécanisme et permettant de concentrer des analytes supportés sur des particules micrométriques. Cependant, un tel dispositif nécessite un couple liquide/substrat particulier, à savoir que la conductivité thermique du substrat doit être 1,6 fois plus faible que celle du liquide. Le choix du liquide contenant les analytes à étudier et du substrat utilisé est donc limité à un nombre restreint de couples potentiels.

Une autre méthode pour créer des écoulements de Marangoni consiste à créer un gradient de concentration de tensioactifs qui génère un gradient de tension de surface. Il est connu que le mélange d'une suspension colloïdale avec un tensioactif permet d'induire un effet solutocapillaire qui permet de concentrer les analytes au centre de la zone de dépôt (Deegan et al., Physical Review E, 2000, 61, 475-485). Cependant, cette méthode entraîne une pollution de la solution d'analytes par les tensioactifs et ne facilite donc pas leur détection.

Le document Küster et al. décrit le dépôt de gouttes comprenant un analyte sur une plaque MALDI en vue d'une analyse par spectrométrie de masse avec source d'ionisation laser assistée par une matrice (Analytical Chemistry, 2013, 85, 1285-1289). Les gouttes comprenant l'analyte sont dispersées dans une phase huileuse avant leur dépôt. Un tel procédé ne permet pas la concentration de l'analyte au centre de la zone de dépôt de la goutte. Le document Nguyen Truskett et al. décrit l'influence des surfactants sur l'évaporation d'une goutte, plus précisément sur le motif de dépôt de particules contenues dans la goutte pendant l'évaporation. (Langmuir, 2003, 19, 8271-8279). Il décrit un procédé comprenant la formation d'une goutte comprenant des particules, la pulvérisation d'un surfactant, acide pentadécanoïque, à la surface de ladite goutte, le dépôt de la goutte sur un substrat, et l'évaporation de la goutte. Cependant un tel procédé ne permet pas de concentrer les particules au centre de la zone de dépôt de la goutte. En effet, après évaporation, les particules présentes initialement dans la goutte ne sont pas concentrées au centre de la goutte et un effet « tâche de café » est clairement observable.

L'objet de la présente invention est donc de fournir un procédé de concentration d'analytes permettant un dépôt homogène, reproductible, sans pollution desdits analytes et sur tous types de substrat afin de permettre la détection de concentrations en analytes plus faibles que celle permise par les méthodes classiques.

RÉSUMÉ

L'invention concerne un procédé de concentration d'au moins un analyte comprenant les étapes suivantes :

- la préparation d'une première phase comprenant au moins un analyte ;
- le dépôt d'une goutte de ladite première phase sur un substrat ;
- le dépôt sur ladite goutte de première phase d'une goutte d'une seconde phase liquide comprenant au moins un tensioactif, ladite seconde phase étant non miscible avec ladite première phase ;
- l'évaporation de la goutte de la seconde phase ; et
- l'évaporation de la goutte de la première phase.

Dans un mode de réalisation, le au moins un tensioactif est non miscible avec la première phase. Dans un mode de réalisation, le au moins un tensioactif est non volatil. Dans un mode de réalisation, le au moins un tensioactif non volatil est fluoré, sélectionné parmi les tensioactifs suivants, mais sans y être limité : 1H, 1H, 2H, 2H-perfluoro-1-octanol ; 5 1H, 1H-perfluoro-1-tetradécanol ; acide perfluorodecanoïque ; 2-(Perfluorooctyl) alcool éthylique ; 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol ; ou bien un composé de la même famille. Dans un mode de réalisation, la première phase ne comprend pas de tensioactif. Dans un mode de réalisation, la première phase est une solution aqueuse. Dans un mode de réalisation, la seconde phase est une huile volatile. Dans un mode de réalisation, l'huile 10 volatile est une huile fluorée, de préférence de type C_nF_{2n+2} ou $C_nF_{2n+1}OC_nH_{2n'+1}$ ou bien un mélange.

L'invention concerne également un procédé de détection d'au moins un analyte comprenant :

- au moins une étape de concentration d'au moins un analyte mettant en œuvre le 15 procédé de concentration selon la présente invention ; et
- la détection du au moins un analyte concentré par une méthode d'analyse physico-chimique ou biologique.

Dans un mode de réalisation, les étapes de concentration d'au moins un analyte telles que définies dans la présente invention peuvent être répétées plusieurs fois avec le même au 20 moins un analyte avant la détection dudit au moins un analyte. Dans un mode de réalisation, le substrat comprend une pluralité de puits chacun de dimensions configurées pour recevoir une pluralité de gouttes de la première phase et de la seconde phase.

L'invention concerne également un système mettant en œuvre le procédé de détection d'au moins un analyte selon la présente invention comprenant :

- 25 - un dispositif microfluidique configuré pour déposer au moins une goutte de la première phase et de la seconde phase sur un substrat ;
- un substrat, ledit substrat étant une plaque comprenant une pluralité de puits chacun de dimensions configurées pour recevoir une pluralité de gouttes de la première phase et de la seconde phase ;

- un moyen de déplacement du substrat configuré pour déplacer ledit substrat par rapport au dispositif microfluidique ; et
- un dispositif de détection physico-chimique ou biologique du au moins un analyte concentré.

5

DÉFINITIONS

Dans la présente invention, les termes ci-dessous sont définis de la manière suivante :

- « **Volatil** » concerne un composé qui a une valeur de pression de vapeur saturante de 10 mbar à 500 mbar à 20°C, de préférence de 100 mbar à 500 mbar à 20°C ; et
10 s'évapore à température ambiante et pression atmosphérique.
- « **Non volatil** » concerne un composé qui ne s'évapore pas à température ambiante et pression atmosphérique.
- « **Tensioactif** » concerne une molécule permettant d'abaisser la tension de surface d'une phase liquide.
- 15 - « **Analyte** » concerne un composé d'intérêt présent dans un échantillon à analyser. Il peut être de toute nature et de toute taille parmi, sans y être limité : cristaux ; biomolécules ; peptides ; protéines ; nanoparticules ou microparticules.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE

- 20 Selon un premier aspect, la présente invention concerne un procédé de concentration d'au moins un analyte.

Le procédé de concentration d'au moins un analyte comprend les étapes suivantes :

- préparation d'une première phase liquide comprenant au moins un analyte ;
- dépôt d'une goutte de ladite première phase sur un substrat ;
- 25 - dépôt sur ladite goutte de première phase d'une goutte d'une seconde phase liquide comprenant au moins un tensioactif, ladite seconde phase étant non miscible avec ladite première phase ;
- évaporation de la goutte de la seconde phase ; et

- évaporation de la goutte de la première phase.

Le procédé de concentration d'au moins un analyte est illustré en figure 8.

L'évaporation de la goutte de la seconde phase entraîne la concentration d'au moins un tensioactif au niveau de la ligne de contact de la goutte de la première phase sur le substrat.

- 5 Cette concentration de molécules de tensioactif crée un gradient de tension de surface par effet solutocapillaire. Cela entraîne l'apparition de recirculations engendrées par les écoulements de Marangoni des régions de plus faible tension de surface vers les régions de plus grande tension de surface, c'est-à-dire de la périphérie de la goutte vers l'apex de la goutte. Les analytes sont alors concentrés au centre de la surface initialement occupée
- 10 par la goutte de la première phase, favorisant leur détection.

De plus, le procédé de la présente invention permet de limiter et/ou d'empêcher la pollution de l'analyte présent dans la goutte de la première phase car le tensioactif n'est pas présent dans la première phase.

- Selon un mode de réalisation, les étapes de dépôt d'une goutte de ladite première phase et de dépôt sur ladite goutte de première phase d'une goutte d'une seconde phase sont
- 15 successives.

Selon un mode de réalisation, les étapes de dépôt d'une goutte de ladite première phase et de dépôt sur ladite goutte de première phase d'une goutte d'une seconde phase sont indépendantes.

- 20 Selon un mode de réalisation, les étapes de dépôt d'une goutte de ladite première phase et de dépôt sur ladite goutte de première phase d'une goutte d'une seconde phase ne sont pas successives.

- Selon un mode de réalisation, les étapes de dépôt d'une goutte de ladite première phase et de dépôt sur ladite goutte de première phase d'une goutte d'une seconde phase sont
- 25 simultanées.

Selon un mode de réalisation, les étapes de dépôt d'une goutte de ladite première phase et de dépôt sur ladite goutte de première phase d'une goutte d'une seconde phase ne sont pas indépendantes.

5 Selon un mode de réalisation, les exemples d'analytes comprennent sans y être limités : peptide, mélange de peptides, chaîne polypeptidique de haut poids moléculaire par exemple une protéine, ou mélange de ceux-ci.

Selon un mode de réalisation, la première phase est préparée en mélangeant une solution d'au moins un analyte avec le liquide de la première phase.

10 Selon un mode de réalisation, la première phase est préparée en mélangeant une solution d'au moins un analyte, ainsi que tout autre composé, hormis un tensioactif, tel qu'une matrice pour MALDI-TOF avec le liquide de la première phase.

15 Selon un mode de réalisation, la matrice pour MALDI-TOF est sélectionnée parmi les matrices suivantes, mais sans y être limitée : 1,5-diaminonaphtalène ; 2-mercaptobenzothiazole ; 4-aminoquinoline ; 2-(2-aminoéthylamino)-5-nitropyridine ; 2',4',6'-trihydroxyacétophénone ; aminoacridine ; acide α -cyano-4-hydroxycinnamique ou bien un composé de la même famille.

Selon un mode de réalisation, le dépôt des gouttes de la première phase et de la seconde phase est effectué sans y être limité, par une pipette ou par un système microfluidique.

20 Selon un mode de réalisation, lors du dépôt de la goutte de la première phase, ladite goutte n'est pas encapsulée, contenue, entourée, enveloppée ou dispersée dans la seconde phase.

Selon un mode de réalisation, lors du dépôt de la goutte de la seconde phase, ladite goutte n'est pas encapsulée, contenue, entourée, enveloppée ou dispersée dans la première phase.

25 Selon un mode de réalisation, les gouttes de la première phase ont un diamètre allant de 10 μm à 1 mm, de préférence de 50 μm à 800 μm , encore plus préférentiellement de 100 μm à 400 μm .

Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un diamètre allant de 10 μm à 1 mm, de préférence de 50 μm à 800 μm , encore plus préférentiellement de 100 μm à 400 μm .

5 Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un diamètre différent du diamètre des gouttes de la première phase.

Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un diamètre supérieur au diamètre des gouttes de la première phase. Ce mode de réalisation a l'avantage de permettre à la goutte de seconde phase de bien englober la goutte de première phase.

10 Selon un mode de réalisation, les gouttes de la première phase ont un volume allant de 1 pL à 1 μL , de préférence de 1 nL à 10 nL.

Selon un mode de réalisation, les gouttes de la première phase ont un volume supérieur à 5 nL.

Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un volume allant de 1 pL à 1 μL , de préférence de 1 nL à 10 nL.

15 Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un volume supérieur à 5 nL.

Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un volume différent du volume des gouttes de la première phase.

20 Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un volume supérieur volume des gouttes de la première phase.

Selon un mode de réalisation, les étapes d'évaporation des gouttes de la première phase et de la seconde phase ont lieu à température ambiante et pression atmosphérique.

25 Selon un mode de réalisation, l'évaporation des gouttes de la première phase et/ou de la seconde phase peut être accélérée par chauffage et/ou par l'application d'un flux gazeux à proximité des gouttes tels qu'un flux de N_2 , Ar, O_2 , d'air, ou tout gaz connu de l'homme du métier ou un mélange de ceux-ci.

Selon un mode de réalisation, la première phase ne comprend pas de tensioactif. Ce mode de réalisation permet de prévenir une contamination de la première phase par des composés externes tels que des tensioactifs.

5 Selon un mode de réalisation, la première phase ne comprend pas le liquide de la seconde phase.

Selon un mode de réalisation, la seconde phase ne comprend pas le liquide de la première phase.

Selon un mode de réalisation, la première phase est une solution aqueuse. Dans ce mode de réalisation, la seconde phase non miscible avec la première phase est une huile.

10 Selon un mode de réalisation, les exemples de solution aqueuse incluent mais ne sont pas limités à : un mélange d'eau et d'au moins un solvant miscible à l'eau comme par exemple un mélange eau-acétonitrile. Un mélange eau-acétonitrile est particulièrement avantageux car l'acétonitrile est miscible à l'eau et permet une dispersion facilitée de composés peu hydrophiles dans la solution aqueuse par son caractère plus hydrophobe de l'eau.

15 Selon un mode de réalisation, les exemples de seconde phase incluent mais ne sont pas limités à : les huiles volatiles telles que les huiles fluorées ; les éthers non miscibles à l'eau tels que, par exemple, l'éther éthylique ; ou des alcanes légers tels que, par exemple, le pentane ou l'hexane.

Selon un mode de réalisation, le tensioactif est miscible dans la seconde phase.

20 Selon un mode de réalisation, la seconde phase est une huile volatile. Ce mode de réalisation permet une évaporation rapide et homogène de la seconde phase.

Selon un mode de réalisation, la goutte d'huile volatile s'évapore en moins d'une minute.

Selon un mode de réalisation, la durée d'évaporation de la goutte d'huile volatile varie entre 1 et 30 secondes, préférentiellement entre 1 et 10 secondes.

25 Selon un mode de réalisation, l'huile volatile est une huile fluorée. Elle présente des avantages pour cette application, comme sa valeur de pression de vapeur saturante, sa

miscibilité avec les tensioactifs employés, l'absence de contamination après évaporation, ou son inertie chimique vis-à-vis de la solution d'analytes.

5 Selon un mode de réalisation, l'huile fluorée est de préférence de type C_nF_{2n+2} avec $n=6$ préférentiellement ou $C_nF_{2n+1}OC_{n'}H_{2n'+1}$ avec $n=3$ ou 4 et $n'=1$ préférentiellement ou bien un mélange.

Selon un mode de réalisation, le au moins un tensioactif n'est pas miscible avec la première phase. Dans ce mode de réalisation, le au moins un tensioactif est miscible avec la seconde phase. Dans ce mode de réalisation, la contamination de la première phase par des molécules de tensioactifs est empêchée, le bruit sur le signal d'analyse engendré par
10 une telle pollution est donc éliminé et la détection des analytes facilitée.

Selon un mode de réalisation, le au moins un tensioactif est non volatil. Dans ce mode de réalisation, à la suite de l'évaporation de la seconde phase, le tensioactif non volatil se retrouve piégé majoritairement près de la ligne de contact de la goutte de la première phase contenant les analytes sur le substrat sans toutefois y pénétrer car non miscible dans
15 cette dernière. Cette concentration de molécules de tensioactif crée un gradient de tension de surface, et entraîne l'apparition de recirculations engendrées par les écoulements de Marangoni de la périphérie de la goutte vers l'apex de la goutte.

Selon un mode de réalisation, le au moins un tensioactif non volatil est fluoré, sélectionné parmi les tensioactifs suivants, mais sans y être limité : 1H, 1H, 2H, 2H-perfluoro-1-octanol ; 1H, 1H-perfluoro-1-tétradécanol ; acide perfluorodecanoïque ;
20 2-(Perfluorooctyl) alcool éthylique ; 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol ; ou bien un composé de la même famille.

Selon un mode de réalisation, le substrat est sélectionné parmi, mais sans y être limité : métal ; verre ; silicium ; polymère tel que le polydiméthylsiloxane ; téflon ; acier
25 inoxydable.

Selon un mode de réalisation, la première phase et le substrat ont des caractéristiques d'hydrophobie contraires. Dans ce mode de réalisation, si la première phase est une solution aqueuse, alors le substrat est hydrophobe, et inversement, si la première phase

est une phase huileuse, alors le substrat est hydrophile. Ce mode de réalisation permet de prévenir l'étalement de la goutte sur le substrat.

Selon un mode de réalisation, la surface du substrat subit un traitement chimique et/ou physique avant le dépôt des gouttes afin d'assurer des caractéristiques d'hydrophobie
5 contraires entre ledit substrat et la première phase.

Des exemples de traitement chimique et/ou physique sont bien connus de l'homme du métier et incluent, sans y être limité, des greffages chimiques ou des traitements physiques (UV ozone, plasma etc...).

Selon un mode de réalisation, le substrat peut être une plaque de surface lisse ou une
10 plaque comprenant au moins un puits.

Selon un mode de réalisation, le substrat n'est pas une plaque comprenant des zones hydrophiles dans un revêtement hydrophobe.

Selon un mode de réalisation, le substrat n'est pas une plaque d'acier recouvert d'une couche de téflon hydrophobe, ladite couche étant structurée par ablation laser pour former
15 des zones hydrophiles sur la plaque.

Selon un mode de réalisation, après évaporation le au moins un analyte est concentré au centre de la zone de dépôt de la goutte de la première phase.

Selon un second aspect, l'invention concerne également un procédé de détection d'au moins un analyte.

20 Le procédé de détection d'au moins un analyte comprend les étapes suivantes :

- préparation d'une première phase liquide comprenant au moins un analyte ;
- dépôt d'une goutte de ladite première phase sur un substrat ;
- dépôt sur ladite goutte de première phase d'une goutte d'une seconde phase liquide comprenant au moins un tensioactif, ladite seconde phase étant non
25 miscible avec ladite première phase ;
- évaporation de la goutte de la seconde phase ;
- évaporation de la goutte de la première phase ; et

- détection et/ou analyse du au moins un analyte concentré par une méthode d'analyse physico-chimique ou biologique.

Selon un autre aspect, l'invention concerne également un procédé de concentration et de détection d'au moins un analyte.

5 Le procédé de concentration et de détection d'au moins un analyte comprend les étapes suivantes :

- préparation d'une première phase liquide comprenant au moins un analyte ;
 - dépôt d'une goutte de ladite première phase sur un substrat ;
 - dépôt sur ladite goutte de première phase d'une goutte d'une seconde phase
- 10 liquide comprenant au moins un tensioactif, ladite seconde phase étant non miscible avec ladite première phase ;
- évaporation de la goutte de la seconde phase ;
 - évaporation de la goutte de la première phase ; et
 - détection et ou analyse du au moins un analyte concentré par une méthode
- 15 d'analyse physico-chimique ou biologique.

Selon un mode de réalisation, les étapes de concentration d'au moins un analyte telles que définies dans le premier aspect de la présente invention peuvent être répétées plusieurs fois avec le même au moins un analyte avant la détection dudit au moins un analyte.

20 Selon un mode de réalisation, la première phase est préparée en mélangeant une solution d'au moins un analyte avec le liquide de la première phase.

Selon un mode de réalisation, la première phase est préparée en mélangeant une solution d'au moins un analyte, ainsi que tout autre composé, hormis un tensioactif, tel qu'une matrice pour MALDI-TOF avec le liquide de la première phase.

25 Selon un mode de réalisation, la matrice pour MALDI-TOF est sélectionnée parmi les matrices suivantes, mais sans y être limitée : 1,5-diaminonaphtalène ; 2-mercaptobenzothiazole ; 4-aminoquinoline ; 2-(2-aminoethylamino)-5-nitropyridine ; 2',4',6'-trihydroxyacétophénone ; aminoacridine ; acide α -cyano-4-hydroxycinnamique ou bien un composé de la même famille.

Selon un mode de réalisation, le dépôt des gouttes de la première et de la seconde phase est effectué, sans y être limité, par une pipette ou un système microfluidique.

Selon un mode de réalisation, lors du dépôt de la goutte de la première phase, ladite goutte n'est pas encapsulée, contenue, entourée, enveloppée ou dispersée dans la seconde phase.

- 5 Selon un mode de réalisation, lors du dépôt de la goutte de la seconde phase, ladite goutte n'est pas encapsulée, contenue, entourée, enveloppée ou dispersée dans la première phase.

10 Selon un mode de réalisation, les gouttes de la première phase ont un diamètre allant de 10 μm à 1 mm, de préférence de 50 μm à 800 μm , encore plus préférentiellement de 100 μm à 400 μm .

Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un diamètre allant de 10 μm à 1 mm, de préférence de 50 μm à 800 μm , encore plus préférentiellement de 100 μm à 400 μm .

15 Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un diamètre différent du diamètre des gouttes de la première phase.

Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un diamètre supérieur au diamètre des gouttes de la première phase. Ce mode de réalisation a l'avantage de permettre à la goutte de seconde phase de bien englober la goutte de première phase.

20 Selon un mode de réalisation, les gouttes de la première phase ont un volume allant de 1 pL à 1 μL , de préférence de 1 nL à 10 nL.

Selon un mode de réalisation, les gouttes de la première phase ont un volume supérieur à 5 nL.

Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un volume allant de 1 pL à 1 μL , de préférence de 1 nL à 10 nL.

25 Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un volume supérieur à 5 nL.

Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un volume différent du volume des gouttes de la première phase.

Selon un mode de réalisation, les gouttes de la seconde phase ont un volume supérieur volume des gouttes de la première phase.

- 5 Selon un mode de réalisation, les étapes d'évaporation des gouttes de la première et de la seconde phase ont lieu à température ambiante et pression atmosphérique.

Selon un mode de réalisation, les étapes d'évaporation des gouttes de la première et de la seconde phase peuvent être accélérées par chauffage et/ou par l'application d'un flux gazeux à proximité des gouttes tels qu'un flux de N₂, Ar, O₂, d'air, ou tout gaz connu de

- 10 l'homme du métier ou un mélange de ceux-ci.

Selon un mode de réalisation, la première phase ne comprend pas de tensioactif.

Selon un mode de réalisation, la première phase ne comprend pas le liquide de la seconde phase.

- 15 Selon un mode de réalisation, la seconde phase ne comprend pas le liquide de la première phase.

Selon un mode de réalisation, la première phase est une solution aqueuse. Dans ce mode de réalisation, la seconde phase non miscible avec la première phase est une huile.

- 20 Selon un mode de réalisation, les exemples de solution aqueuse incluent mais ne sont pas limités à : un mélange d'eau et d'au moins un solvant miscible à l'eau comme par exemple un mélange eau-acétonitrile. Un mélange eau-acétonitrile est particulièrement avantageux car l'acétonitrile est miscible à l'eau et permet une dispersion facilitée de composés peu hydrophiles dans la solution aqueuse par son caractère plus hydrophobe de l'eau.

- 25 Selon un mode de réalisation, les exemples de seconde phase incluent mais ne sont pas limités à : les huiles volatiles telles que les huiles fluorées ; les éthers non miscibles à l'eau tels que, par exemple, l'éther éthylique ; ou des alcanes légers tels que, par exemple, le pentane ou l'hexane.

Selon un mode de réalisation, le tensioactif est miscible dans la seconde phase.

Selon un mode de réalisation, la seconde phase est une huile volatile.

Selon un mode de réalisation, la goutte d'huile volatile s'évapore en moins d'une minute.

5 Selon un mode de réalisation, la durée d'évaporation de la goutte d'huile volatile varie entre 1 et 30 secondes, préférentiellement entre 1 et 10 secondes.

Selon un mode de réalisation, l'huile volatile est une huile fluorée.

Selon un mode de réalisation, l'huile fluorée est de préférence de type C_nF_{2n+2} avec $n=6$ préférentiellement ou $C_nF_{2n+1}OC_{n'}H_{2n'+1}$ avec $n=3$ ou 4 et $n'=1$ préférentiellement ou bien un mélange.

10 Selon un mode de réalisation, le au moins un tensioactif n'est pas miscible avec la première phase. Dans ce mode de réalisation, le au moins un tensioactif est miscible avec la seconde phase.

Selon un mode de réalisation, le au moins un tensioactif est non volatil.

15 Selon un mode de réalisation, le au moins un tensioactif non volatil est fluoré, sélectionné parmi les tensioactifs suivants, mais sans y être limité : 1H, 1H, 2H, 2H-perfluoro-1-octanol ; 1H, 1H-perfluoro-1-tetradécanol ; acide perfluorodecanoïque ; 2-(Perfluorooctyl) alcool éthylique ; 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol ; ou bien un composé de la même famille.

20 Selon un mode de réalisation, le substrat est sélectionné parmi, mais sans y être limité : métal ; verre ; silicium ; polymère tel que le polydiméthylsiloxane ; téflon ; acier inoxydable.

25 Selon un mode de réalisation, la première phase et le substrat ont des caractéristiques d'hydrophobie contraires. Dans ce mode de réalisation, si la première phase est une solution aqueuse, alors le substrat est hydrophobe, et inversement, si la première phase est une phase huileuse, alors le substrat est hydrophile. Ce mode de réalisation permet de prévenir l'étalement de la goutte sur le substrat.

Selon un mode de réalisation, la surface du substrat subit un traitement chimique et/ou physique avant le dépôt des gouttes afin d'assurer des caractéristiques d'hydrophobie contraires entre ledit substrat et la première phase.

Des exemples de traitement chimique et/ou physique sont bien connus de l'homme du métier et incluent, sans y être limité, des greffages chimiques ou des traitements physiques (UV ozone, plasma etc...).

Selon un mode de réalisation, le substrat peut être une plaque de surface lisse ou une plaque comprenant au moins un puits.

Selon un mode de réalisation, après évaporation le au moins un analyte est concentré au centre de la zone de dépôt de la goutte de la première phase.

Selon un mode de réalisation, après évaporation le au moins un analyte est concentré au centre du puits dans lequel a été déposée la première goutte.

Selon un mode de réalisation, la méthode d'analyse physico-chimique ou biologique pour la détection du au moins un analyte peut être choisie parmi, sans être limitée à : la spectrométrie de masse, la spectrométrie de masse MALDI-TOF, la microscopie par fluorescence, des microarrays, des tests immunochimiques ou toute autre technique d'analyse de chimie analytique ou de biologie.

Le procédé de concentration d'au moins un analyte tel que défini dans la présente invention est particulièrement avantageux pour la détection d'analytes par les méthodes d'analyse ci-dessus. En effet, l'homogénéité et la reproductibilité des dépôts de solution d'analytes sont deux paramètres importants pour atteindre une analyse efficace. En particulier, la spectrométrie de masse à désorption/ionisation laser assistée par matrice et couplée à un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF-SM), technique d'analyse couramment utilisée en protéomique et en particulier dans toutes les phases de développement de biomarqueurs, présente de nombreux avantages tels que la sensibilité, la précision et la rapidité d'analyse. La sensibilité de détection de la technique MALDI-TOF-SM est par ailleurs fortement corrélée à la masse de la biomolécule à analyser. Cependant, cette technique présente quelques limitations concernant la

reproductibilité du signal obtenu principalement liées à l'hétérogénéité lors du processus de séchage des échantillons. Le procédé de concentration selon la présente invention permet de répondre avantageusement à cet inconvénient.

5 Selon un troisième aspect, l'invention concerne également une plaque d'analyse, en particulier une plaque MALDI.

Selon un mode de réalisation, la plaque d'analyse est lisse.

10 Selon un mode de réalisation, la plaque d'analyse comprend une pluralité de puits. Cette plaque d'analyse permet de faire des dépôts homogènes et reproductibles. Elle a aussi pour avantage de permettre des dépôts multiples en répétant les dépôts de gouttes de solution dans un même puits, conduisant à une augmentation de la concentration en analytes dans ledit puits.

Selon un mode de réalisation, chaque puits est configuré pour recevoir au moins une goutte d'une solution.

15 Selon un mode de réalisation, chaque puits a un diamètre allant de 1 μm à 10 mm, de 500 μm à 1 mm ou encore d'environ 700 μm .

Selon un mode de réalisation, chaque puits a une hauteur allant de 1 μm à 500 μm , de 50 μm à 250 μm ou encore d'environ 100 μm .

Selon un mode de réalisation, chaque puits a un volume allant de 1,5 fL à 5 μL , de préférence de 50 fL à 1 μL , de préférence de 1 nL à 500 nL.

20 Selon un mode de réalisation, chaque puits a un volume minimum de 100 nL.

Selon un mode de réalisation, chaque puits comporte une dimension de l'ordre de 700 μm .

Selon un mode de réalisation, chaque puits a une hauteur de 100 μm et un diamètre de 700 μm .

Selon un mode de réalisation, chaque puits a une hauteur de minimum de 100 μm .

25 Selon un mode de réalisation, chaque puits a un diamètre minimum de 300 μm .

Selon un mode de réalisation, chaque puits a un diamètre strictement supérieur à 300 μm .

Selon un mode de réalisation, tous les puits ont la même hauteur et/ou le même diamètre.

Selon un mode de réalisation, les puits ont des hauteurs et/ou des diamètres différents.

5 Selon un mode de réalisation, la hauteur et/ou le diamètre des puits varie selon leur position sur la plaque.

Selon un mode de réalisation, le matériau de la plaque d'analyse est sélectionné parmi, mais sans y être limité : métal, verre, silicium, polymère, téflon, acier inoxydable.

10 Selon un mode de réalisation, la plaque d'analyse comprenant une pluralité de puits est fabriquée par photolithographie, préférentiellement par photolithographie d'un wafer de silicium surmonté d'une résine photosensible.

Selon un mode de réalisation, la plaque d'analyse n'est pas une plaque comprenant des zones hydrophiles dans un revêtement hydrophobe.

15 Selon un mode de réalisation, la plaque d'analyse n'est pas une plaque d'acier recouvert d'une couche de téflon hydrophobe, ladite couche étant structurée par ablation laser pour former des zones hydrophiles sur la plaque.

Selon un mode de réalisation, la plaque d'analyse comprenant une pluralité de puits est fabriquée par usinage, préférentiellement par usinage d'une plaque en acier inoxydable.

Dans un mode de réalisation, la plaque selon la présente invention est avantageusement utilisée comme substrat selon le premier ou le second aspect de la présente invention.

20 Dans un mode de réalisation, chaque puits est configuré pour recevoir une pluralité de gouttes de la première phase et de la seconde phase. Ce mode de réalisation a pour avantage de permettre des dépôts multiples en répétant les dépôts de gouttes dans un même puits, chacun des dépôts étant séparé par une étape d'évaporation de la goutte de la seconde phase et une étape d'évaporation de la goutte de la première phase. Ce mode
25 de réalisation conduit à une augmentation de la concentration en analytes dans ledit puits.

Selon un quatrième aspect, l'invention concerne également un système mettant en œuvre le procédé de détection d'au moins un analyte selon la présente invention.

Le système mettant en œuvre le procédé de détection d'au moins un analyte selon la présente invention comprend :

- 5 - un dispositif microfluidique configuré pour déposer au moins une goutte de la première phase et de la seconde phase comprenant au moins un tensioactif sur un substrat ;
- un substrat, ledit substrat étant une plaque comprenant une pluralité de puits chacun des puits étant de dimensions configurées pour recevoir une pluralité de
- 10 gouttes, préférentiellement au moins deux gouttes dont une goutte de la première phase et une goutte de la seconde phase ;
- un moyen de déplacement du substrat configuré pour déplacer ledit substrat par rapport au dispositif microfluidique ; et
- un dispositif de détection physico-chimique ou biologique du au moins un
- 15 analyte concentré.

Selon un autre aspect, l'invention concerne également un système de concentration et de détection d'au moins un analyte selon la présente invention.

Le système de concentration et de détection d'au moins un analyte selon la présente invention comprend :

- 20 - un dispositif microfluidique configuré pour déposer au moins une goutte de la première phase et de la seconde phase comprenant au moins un tensioactif sur un substrat ;
- un substrat, ledit substrat étant une plaque lisse ou comprenant une pluralité de puits chacun des puits étant configuré pour recevoir au moins deux gouttes dont
- 25 une goutte de la première phase et une goutte de la seconde phase ;
- un moyen de déplacement du substrat configuré pour déplacer ledit substrat par rapport au dispositif microfluidique ; et
- un dispositif de détection physico-chimique ou biologique du au moins un analyte concentré.

Selon un mode de réalisation, le système comprend en outre un premier réservoir configuré pour accueillir la première phase comprenant au moins un analyte et un second réservoir configuré pour accueillir la seconde phase comprenant au moins un tensioactif, chaque réservoir étant en communication fluidique avec le dispositif microfluidique.

- 5 Selon un mode de réalisation, le premier réservoir et le second réservoir sont indépendants.

Selon un mode de réalisation, le premier réservoir et le second réservoir sont des tubes, des canaux ou tout récipient connu de l'homme du métier.

- 10 Selon un mode de réalisation illustré dans la figure 7, le dispositif microfluidique comprend 2 tubes ou canaux (5, 6), le premier tube (ou canal) 5 étant configuré pour transporter la première phase 1 indépendamment de la seconde phase 4 et le second tube (ou canal) 6 étant configuré pour transporter la seconde phase 4 indépendamment de la première phase 1.

- 15 Selon un mode de réalisation illustré dans la figure 7, les 2 tubes ou canaux (5, 6) se rencontrent avant dépôt à une jonction 7 à laquelle une goutte de la première phase 1 est générée.

Selon un mode de réalisation, le dispositif microfluidique comprend un troisième tube ou canal 8 dans lequel la goutte de la première phase 1 générée à la jonction 7 des deux premiers tubes ou canaux (5, 6) est transportée dans la seconde phase 4.

- 20 Selon un mode de réalisation, le dispositif microfluidique est un dispositif de microfluidique digitale.

Selon un mode de réalisation, le dispositif microfluidique est configuré pour déposer successivement et indépendamment au moins une goutte de la première phase et de la seconde phase comprenant au moins un tensioactif sur un substrat.

- 25 Selon un mode de réalisation, le dispositif microfluidique est configuré pour déposer successivement et indépendamment au moins une goutte de la première phase et une

goutte de la seconde phase comprenant au moins un tensioactif sur un substrat, la goutte de la seconde phase étant déposée sur la goutte de la première phase.

Selon un mode de réalisation, le substrat est la plaque d'analyse selon le troisième aspect de la présente invention.

- 5 Selon un mode de réalisation, le substrat peut être une plaque de surface lisse ou une plaque comprenant au moins un puits.

Selon un mode de réalisation, le substrat est une plaque d'analyse telle que décrite ci-dessus.

- 10 Selon un mode de réalisation, le substrat comprend une pluralité de puits. Le substrat d'analyse permet de faire des dépôts homogènes et reproductibles. Il a aussi pour avantage de permettre des dépôts multiples en répétant les dépôts de gouttes de solution dans un même puits, conduisant à une augmentation de la concentration en analytes dans ledit puits.

- 15 Selon un mode de réalisation, chaque puits est configuré pour recevoir au moins une goutte d'une solution.

Selon un mode de réalisation, chaque puits a un volume allant de 1,5 fL à 5 μ L, de préférence de 50 fL à 1 μ L, de préférence de 1 nL à 500 nL.

Selon un mode de réalisation, chaque puits a un volume minimum de 100 nL.

Selon un mode de réalisation, chaque puits comporte une dimension de l'ordre de 700 μ m.

- 20 Selon un mode de réalisation, chaque puits a une hauteur de 100 μ m et un diamètre de 700 μ m.

Selon un mode de réalisation, chaque puits a une hauteur de minimum de 100 μ m.

Selon un mode de réalisation, chaque puits a un diamètre minimum de 300 μ m.

Selon un mode de réalisation, chaque puits a un diamètre strictement supérieur à 300 μ m.

Selon un mode de réalisation, tous les puits ont la même hauteur et/ou le même diamètre.

Selon un mode de réalisation, les puits ont des hauteurs et/ou des diamètres différents.

Selon un mode de réalisation, la hauteur et/ou le diamètre des puits varient selon leur position sur la plaque.

- 5 Selon un mode de réalisation, après évaporation le au moins un analyte est concentré au centre de la zone de dépôt de la goutte de la première phase.

Selon un mode de réalisation, après évaporation le au moins un analyte est concentré au centre du puits dans lequel a été déposée la première goutte.

- 10 Selon un mode de réalisation, le matériau du substrat est sélectionné parmi, mais sans y être limité : métal, verre, silicium, polymère, téflon, acier inoxydable.

Selon un mode de réalisation, le substrat n'est pas une plaque comprenant des zones hydrophiles dans un revêtement hydrophobe.

- 15 Selon un mode de réalisation, le substrat n'est pas une plaque d'acier recouvert d'une couche de téflon hydrophobe, ladite couche étant structurée par ablation laser pour former des zones hydrophiles sur la plaque.

Selon un mode de réalisation, lors du dépôt de la goutte de la première phase, ladite goutte n'est pas encapsulée, contenue, entourée, enveloppée ou dispersée dans la seconde phase.

- 20 Selon un mode de réalisation, lors du dépôt de la goutte de la seconde phase, ladite goutte n'est pas encapsulée, contenue, entourée, enveloppée ou dispersée dans la première phase.

Selon un mode de réalisation, lors du dépôt de la goutte de la première phase, ladite goutte est encapsulée, contenue, entourée, enveloppée ou dispersée dans la seconde phase.

Selon un mode de réalisation, lors du dépôt de la goutte de la seconde phase, ladite goutte est encapsulée, contenue, entourée, enveloppée ou dispersée dans la première phase.

Selon un mode de réalisation, la goutte de la première phase est formée indépendamment de la goutte de la seconde phase.

Selon un mode de réalisation, la goutte de la seconde phase est formée indépendamment de la goutte de la première phase.

- 5 Selon un mode de réalisation, la goutte de la première phase est déposée indépendamment de la goutte de la seconde phase.

Selon un mode de réalisation, la goutte de la seconde phase est déposée indépendamment de la goutte de la première phase.

- 10 Selon un mode de réalisation, la goutte de la première phase et la goutte de la seconde phase sont formées simultanément.

Selon un mode de réalisation, la goutte de la première phase et la goutte de la seconde phase sont déposées simultanément.

Selon un mode de réalisation, la goutte de la première phase est formée dans la seconde phase.

- 15 Selon un mode de réalisation, la goutte de la seconde phase est formée dans la première phase.

Selon un mode de réalisation, la goutte de la première phase est déposée dans la seconde phase.

- 20 Selon un mode de réalisation, la goutte de la seconde phase est déposée dans la première phase.

Selon un mode de réalisation, la goutte de la première phase est transportée dans la seconde phase.

Selon un mode de réalisation, le moyen de déplacement du substrat par rapport au dispositif microfluidique est un moyen mécanique motorisé.

Selon un mode de réalisation, le dispositif de détection physico-chimique ou biologique pour la détection du au moins un analyte peut être choisi parmi, sans être limité à : la spectrométrie de masse ; la spectrométrie de masse MALDI-TOF ; la microscopie par fluorescence ; microarray ; tests immunochimiques ou toute autre technique d'analyse de chimie analytique ou de biologie.

BRÈVE DESCRIPTION DES FIGURES

La **Figure 1** comprend une représentation schématique du dépôt de goutte selon l'art antérieur, d'un dépôt de deux gouttes non miscibles et le dépôt selon la présente invention, et les clichés correspondants auxdits dépôts après l'évaporation de la seconde phase et de la première phase.

La **Figure 2** illustre l'influence du procédé de concentration d'au moins un analyte sur la détection dudit analyte par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

La **Figure 3** illustre l'influence du procédé de concentration d'au moins un analyte sur la linéarité et la reproductibilité du signal obtenu par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

La **Figure 4** illustre l'influence de la technique du multi-dépôt sur la plaque d'analyse selon la présente invention sur la détection dudit analyte par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

La **Figure 5** présente des spectres d'analyse MALDI-TOF d'un mélange de peptides concentré d'après le procédé de la présente invention.

La **Figure 6** illustre l'influence du procédé de concentration d'au moins un analyte de la présente invention sur la concentration d'un analyte au centre de la zone de dépôt.

La **Figure 7** représente un dispositif microfluidique comprenant 2 tubes ou canaux (5, 6), une jonction 7 et un troisième tube ou canal 8.

La **Figure 8** comprend une représentation schématique du dépôt selon la présente invention, et le cliché correspondant audit dépôt après l'évaporation de la seconde phase et de la première phase.

5 **EXEMPLES**

La présente invention se comprendra mieux à la lecture des exemples suivants qui illustrent non-limitativement l'invention.

Exemple 1 : Amélioration de la sensibilité de l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF par concentration de l'analyte sur une plaque MALDI

10 *Matériel et Méthodes*

Matériel

- une solution de matrice MALDI (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique à 2 mg/ml) comprenant un mélange d'acétonitrile et d'eau distillée acidifiée dans un ratio 50/50 ;
- 15 - une huile contenant 10 % (m/m) de 2-(Perfluorooctyl) alcool éthylique ; et
- une solution mère d'angiotensine II, comprenant le peptide à une concentration de 1 pmol/L dans une solution de 0,1% d'acide trifluoroacétique.

Méthodes

Pour chaque série d'expérimentations, tout le matériel est préparé juste avant les analyses.

- 20 La solution de matrice est préparée en diluant la matrice à une concentration de 2 mg/ml dans un mélange d'acétonitrile et d'eau distillée acidifiée dans un ratio 50/50. Le mélange nécessite 5 min de vortex, puis 10 min dans un bain à ultrasons pour que la solubilisation soit complète.

- 25 La solution mère de peptide est préparée en diluant l'angiotensine II à une concentration de 1 pmol/L dans une solution de 0,1% d'acide trifluoroacétique et est stockée à -20°C.

Des aliquots de peptide à 100 fmol/ μ L sont ensuite préparés à partir d'un aliquot à 1 pmol/ μ L en le diluant dans un mélange eau distillée/acétonitrile (75/25). Pour chaque série d'analyse, un aliquot frais est dilué à la concentration voulue par un mélange eau distillée/acétonitrile (75/25) acidifié et contenant de la matrice à 2 mg/ml.

- 5 Un premier dépôt est effectué de façon classique, à savoir une goutte de solution contenant les peptides est déposée sur un substrat métallique à l'aide d'une pipette. S'en suit une évaporation, qui va permettre aux analytes non volatils de se retrouver piégés à la surface du substrat.

- 10 Un second dépôt est effectué en déposant successivement une goutte de solution contenant les peptides et une goutte d'huile volatile sans tensioactif sur cette première goutte sur un substrat métallique à l'aide d'une pipette.

Un troisième dépôt est effectué selon le procédé de concentration d'au moins un analyte tel que défini dans la présente invention.

Le premier dépôt et le troisième dépôt sont ensuite analysés par MALDI-TOF-SM.

15 *Résultats*

- Les deux premiers dépôts décrits ci-dessus entraînent une répartition des analytes sur toute la surface de contact entre la goutte et le substrat, menant souvent à des phénomènes de tâche de café décrits plus haut. Le procédé de concentration d'au moins un analyte tel que défini dans la présente invention permet une concentration dudit analyte au centre de
- 20 la surface occupée initialement par la goutte.

La figure 1 illustre les trois dépôts effectués :

- le dépôt selon l'art antérieur comprenant une goutte de la première phase (1) contenant au moins un analyte (11) déposée sur un substrat (2) ;
- le second dépôt comprenant une goutte de la première phase (1) contenant au
- 25 moins un analyte (11) surmontée d'une goutte de la seconde phase (3), sans tensioactif, non miscible avec la première phase (1) déposées sur un substrat (2) ;
- le troisième dépôt sur un substrat (2) selon le procédé de concentration d'au moins un analyte (11) tel que défini dans la présente invention comprenant une

goutte de la première phase (1) contenant au moins un analyte (11) surmontée d'une goutte de la seconde phase (4) contenant au moins un tensioactif (41), ladite seconde phase (4) étant non miscible avec la première phase (1).

Sur les spectres de masse présentés en figure 2, l'intensité du signal passe de 2085 à 60000 pour le dépôt classique et le dépôt selon le procédé de la présente invention respectivement, soit une augmentation du signal d'un facteur 30.

Exemple 2 : Dépôt sur plaque MALDI à l'aide d'un système de microfluidique digitale

Matériel et Méthodes

Matériel

- 10 - une solution de matrice MALDI (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique à 2 mg/ml) comprenant un mélange d'acétonitrile et d'eau distillée acidifiée dans un ratio 50/50 ;
- quatre solutions contenant un analyte tel que l'angiotensine II à différentes concentrations (de 1 nM à 20 nM) ;
- 15 - une huile contenant 10% (m/m) de 2-(Perfluorooctyl) alcool éthylique.

Méthodes

Quatre solutions contenant l'angiotensine II à différentes concentrations (de 1 nM à 20 nM) ont été séparément utilisées pour générer des gouttes dans un système de microfluidique digitale puis déposées selon le procédé de concentration de la présente invention sur une plaque commerciale MALDI en acier inoxydable pour analyse. Pour 20 chaque concentration, 10 répétitions ont été réalisées, à la fin desquelles, le nombre de gouttes déposées et donc la quantité précise d'analyte déposé est calculée puis reliée aux intensités correspondantes obtenues par l'analyse en MALDI-TOF.

Résultats

25 Les limites de détection en matière de sensibilité de l'appareil sont atteintes selon la documentation du constructeur pour l'instrument utilisé. Le procédé de concentration de la présente invention permet donc de détecter des quantités très faibles de peptide à partir

d'une solution sub-nanomolaire. De plus, une forte relation entre l'intensité du signal obtenu en MALDI-TOF et la quantité de peptide déposée a été observée (représenté sur la figure 3), ce qui atteste de la reproductibilité de l'expérience, non atteignable pour un mode de dépôt de l'art antérieur.

5 Exemple 3 : Dépôt sur plaque comportant des puits à l'aide d'un système de microfluidique digitale

Matériel et Méthodes

Matériel

- une solution de matrice MALDI (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique à
10 2 mg/ml) comprenant un mélange d'acétonitrile et d'eau distillée acidifiée dans un ratio 50/50 ;
- une solution de peptide, angiotensine II, à 0,1 nM ;
- une huile contenant 10% (m/m) de 2-(Perfluorooctyl) alcool éthylique ;
- un wafer de silicium ; et
- 15 - une résine photosensible.

Méthodes

Sur un wafer de silicium, préalablement nettoyé, est déposée une résine photosensible de type SU-8 3035. Le wafer est ensuite placé dans un spin-coater permettant d'obtenir une couche uniforme de résine sur le wafer de silicium. Le wafer est ensuite déposé sur une
20 plaque chauffante pendant 30 minutes à 95°C. Il est ensuite placé dans une insoleuse ultra-violet et recouvert d'un masque sur lequel est imprimée la forme des puits. Le wafer subit ensuite une illumination pendant 17 secondes à une puissance de 20 mW/cm². Le wafer est ensuite déposé dans un bain contenant le liquide de développement. Après 10 minutes, la résine n'ayant pas été irradiée est dissoute et les puits apparaissent. Le
25 wafer est nettoyé à l'isopropanol puis séché. La plaque ainsi obtenue comprend une pluralité de puits de 700 μ m de diamètre et 100 μ m de hauteur.

Ces puits permettent de collecter les gouttes générées par le système de microfluidique digitale. Plusieurs dépôts selon le procédé de concentration de la présente invention sont effectués dans un même puits.

Résultats

- 5 En répétant les dépôts de gouttes dans un même puits, la quantité d'analytes présents dans ce puits est augmentée de façon significative. La figure 4 compare un dépôt « simple » par le système microfluidique et un multi-dépôt par le système microfluidique sur la plaque à puits, et les deux dépôts ont été effectués selon le procédé de concentration de la présente invention. Le rapport signal sur bruit est amélioré et l'intensité est augmentée
- 10 d'un ordre de grandeur.

Exemple 4 : Dépôt d'un mélange de peptides sur plaque MALDI à l'aide d'un système de microfluidique digitale

Matériel et Méthodes

Matériel

- 15 - une solution de matrice MALDI (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique à 2mg/ml) comprenant un mélange d'acétonitrile et d'eau distillée acidifiée dans un ratio 50/50 ;
- une solution contenant un analyte tel qu'un mélange de peptides de concentration 2.5nM ;
- 20 - une huile contenant 10 % (m/m) de 2-(Perfluorooctyl) alcool éthylique.

Méthodes

- Le dépôt est effectué par formation de gouttes, générées par un système de microfluidique digitale, de solution contenant le mélange de peptides puis déposées selon le procédé de concentration de la présente invention sur une plaque commerciale MALDI en acier
- 25 inoxydable pour analyse. S'en suit une évaporation, qui va permettre aux analytes non volatils de se retrouver piégés à la surface du substrat.

Résultats

L'analyse MALDI-TOF de tels dépôts permet la détection de 10 peptides à partir d'une quantité déposée de 250 attomoles de mélange. Le gain de la présente invention pour l'étude de mélange de peptides est ainsi prouvée étant donné que l'analyse impliquant un dépôt classique (goutte de solution contenant les peptides et goutte de solution de matrice sont déposées sur un substrat métallique à l'aide d'une pipette) d'une quantité plus importante du même mélange (2500 attomoles) ne permet la détection que de 4 peptides.

La figure 5 présente les spectres d'analyse MALDI-TOF. Les marqueurs rouges correspondent aux masses des peptides détectés.

Exemple 5 : Dépôt d'une protéine sur plaque MALDI

Matériel et Méthodes

Matériel

- une solution de matrice MALDI (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique à 2mg/ml) comprenant un mélange d'acétonitrile et d'eau distillée acidifiée dans un ratio 50/50 ;
- une solution contenant un analyte tel qu'une chaîne polypeptidique (protéine MMP12 marquée par un fluorophore : fluorescéine) ;
- une huile contenant 10 % (m/m) de 2-(Perfluorooctyl) alcool éthylique.

Méthodes

- Le dépôt d'une solution de protéine est effectué selon le procédé de concentration de l'invention. S'en suit une évaporation, qui va permettre aux analytes non volatils de se retrouver piégés à la surface du substrat.

Résultats

- Le procédé de concentration d'au moins un analyte tel que défini dans la présente invention permet une concentration d'une protéine au centre de la surface occupée initialement par la goutte, ce qui n'est pas observé dans le cas d'un dépôt par une méthode

classique (figure 6). En effet, le dépôt de la même solution de protéine par une méthode classique (à savoir une goutte de solution contenant la protéine est déposée sur un substrat métallique à l'aide d'une pipette) conduit à une répartition de la protéine sur toute la surface de contact entre la goutte et le substrat, menant souvent à des phénomènes de tâche de café décrits plus haut.

REFERENCES

- 1 -- Première phase
- 11 -- Analyte
- 10 2 -- Substrat
- 3 -- Seconde phase ne comprenant pas de tensioactif
- 4 -- Seconde phase
- 41 -- Tensioactif
- 5 -- Tube ou canal
- 15 6 -- Tube ou canal
- 7 -- Jonction
- 8 -- Troisième tube ou canal

REVENDICATIONS

1. Procédé de concentration d'au moins un analyte (11) comprenant les étapes suivantes :
 - 5 - préparation d'une première phase (1) comprenant au moins un analyte (11) ;
 - dépôt d'une goutte de ladite première phase (1) sur un substrat (2) ;
 - dépôt sur ladite goutte de première phase (1) d'une goutte d'une seconde phase (4) liquide comprenant au moins un tensioactif (41), ladite seconde phase (4) étant non miscible avec ladite première phase (1) ;
 - 10 - évaporation de la goutte de la seconde phase (4) ; et
 - évaporation de la goutte de la première phase (1).
2. Procédé de concentration d'au moins un analyte (11) selon la revendication 1, dans lequel le au moins un tensioactif (41) est non miscible avec la première phase (1).
3. Procédé de concentration d'au moins un analyte (11) selon l'une quelconque des
15 revendications 1 à 2, dans lequel le au moins un tensioactif (41) est non volatil.
4. Procédé de concentration d'au moins un analyte (11) selon la revendication 3, dans lequel le au moins un tensioactif (41) non volatil est fluoré, par exemple sélectionné parmi les tensioactifs suivants, mais sans y être limité : 1H, 1H, 2H, 2H-perfluoro-1-octanol ; 1H, 1H-perfluoro-1-tetradécanol ; acide perfluorodecanoïque ;
20 2-(Perfluorooctyl) alcool éthylique ; 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol ; ou bien un composé de la même famille.
5. Procédé de concentration d'au moins un analyte (11) selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel la première phase (1) ne comprend pas de tensioactif (41).
- 25 6. Procédé de concentration d'au moins un analyte (11) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la première phase (1) est une solution aqueuse.
7. Procédé de concentration d'au moins un analyte (11) selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel la seconde phase (4) est une huile volatile.

8. Procédé de concentration d'au moins un analyte (11) selon la revendication 7, dans lequel l'huile volatile est une huile fluorée, de préférence de type C_nF_{2n+2} ou $C_nF_{2n+1}OC_nH_{2n'+1}$ ou bien un mélange.
- 5 9. Procédé de concentration d'au moins un analyte (11) selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel les étapes de dépôt d'une goutte de ladite première phase et de dépôt sur ladite goutte de première phase d'une goutte d'une seconde phase sont successives.
- 10 10. Procédé de concentration et de détection d'au moins un analyte (11) selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel le substrat (2) comprend une pluralité de puits chacun de dimensions configurées pour recevoir une pluralité de gouttes de la première phase (1) et de la seconde phase (4).
11. Procédé de concentration et de détection d'au moins un analyte (11) comprenant :
- au moins une étape de concentration d'au moins un analyte (11) selon le procédé de concentration selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ; et
15 - détection et/ou analyse du au moins un analyte (11) concentré par une méthode d'analyse physico-chimique ou biologique.
12. Système de concentration et de détection d'au moins un analyte (11) comprenant :
- un dispositif microfluidique configuré pour déposer au moins une goutte d'une première phase (1) et d'une seconde phase (4) comprenant au moins un tensioactif sur un substrat (2) ;
20 - un substrat (2), ledit substrat (2) étant une plaque lisse ou comprenant une pluralité de puits chacun étant configuré pour recevoir aux moins deux gouttes dont une goutte de la première phase (1) et une goutte de la seconde phase (4) ;
- un moyen de déplacement du substrat (2) configuré pour déplacer ledit substrat (2) par rapport au dispositif microfluidique ; et
25 - un dispositif de détection physico-chimique ou biologique du au moins un analyte (11) concentré.
13. Système de concentration et de détection d'au moins un analyte (11) selon la revendication 12 comprenant en outre premier réservoir configuré pour accueillir

la première phase comprenant au moins un analyte et un second réservoir configuré pour accueillir la seconde phase comprenant au moins un tensioactif, chaque réservoir étant en communication fluidique avec le dispositif microfluidique.

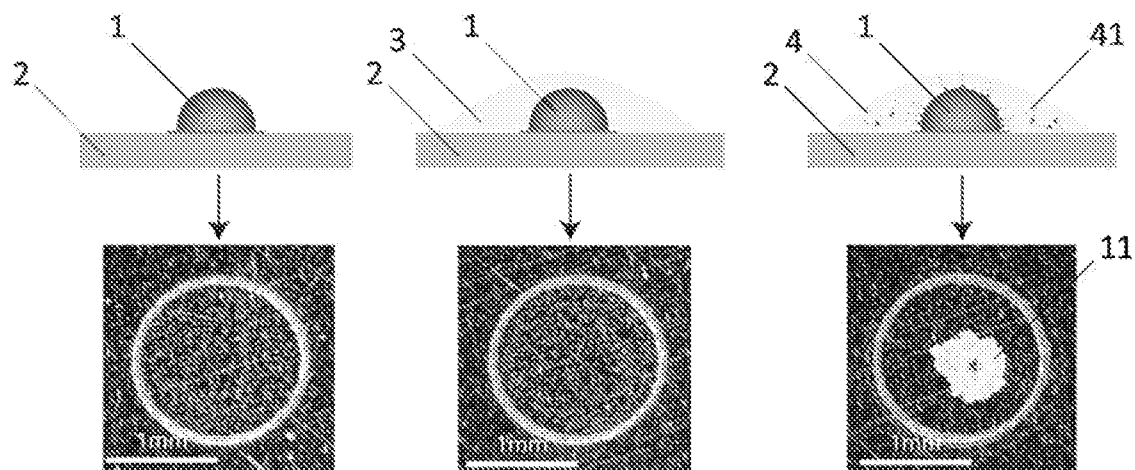


FIG. 1

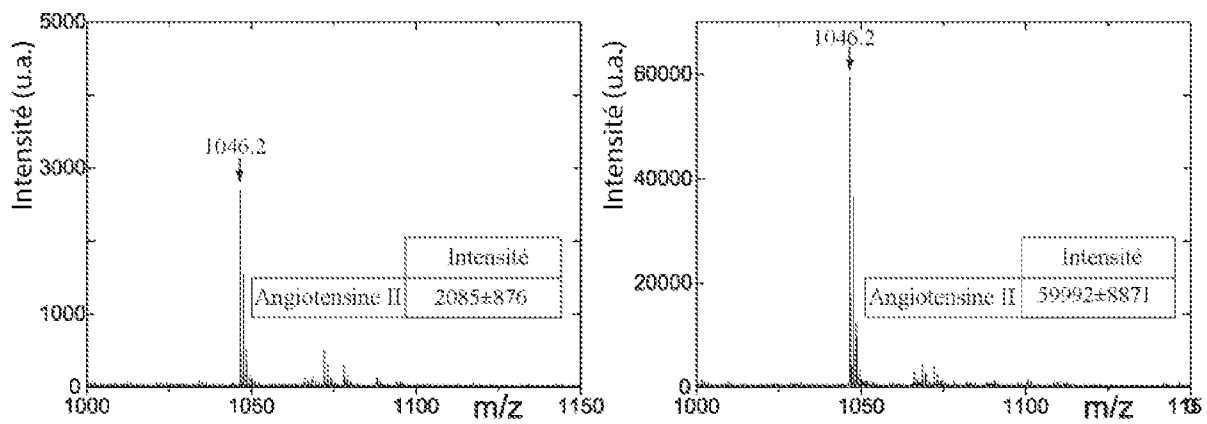


FIG. 2

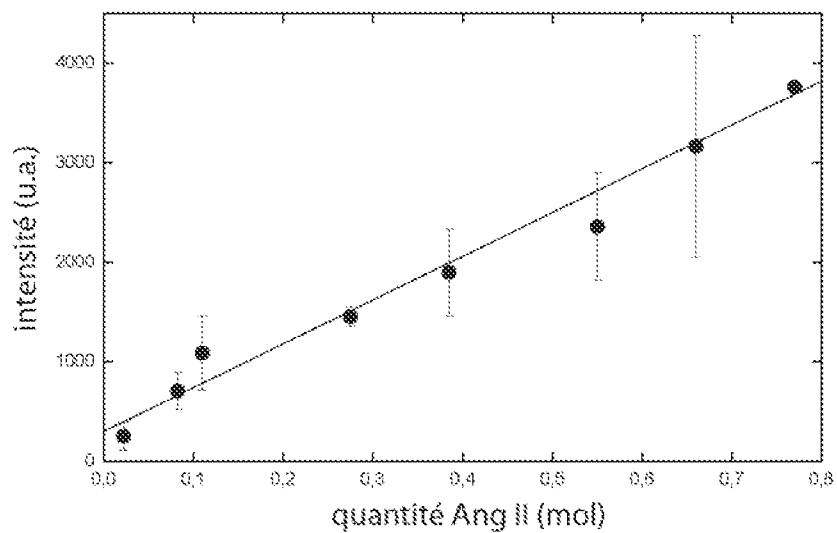


FIG. 3

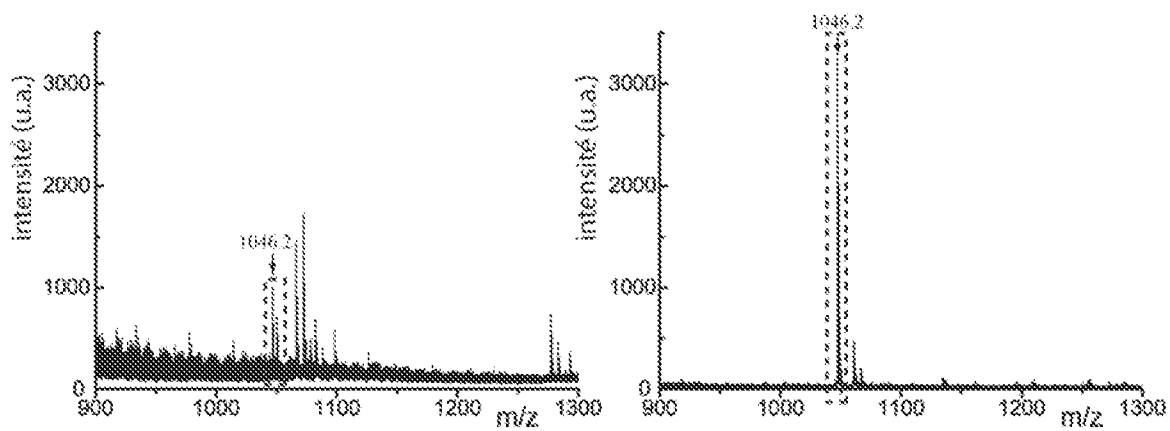


FIG. 4

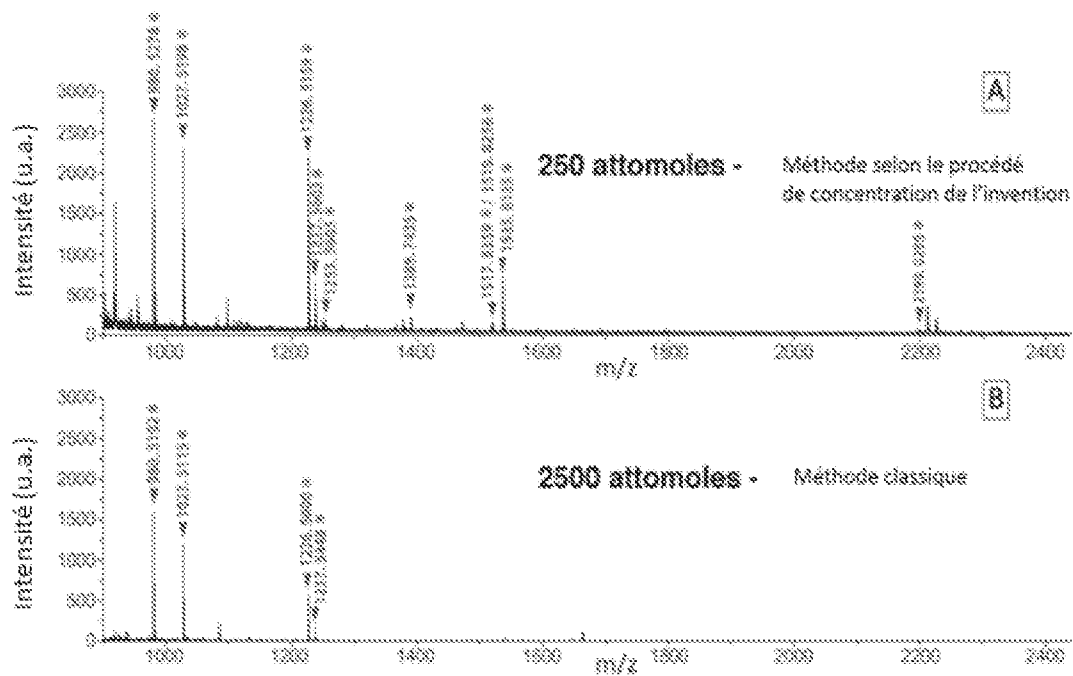


FIG. 5

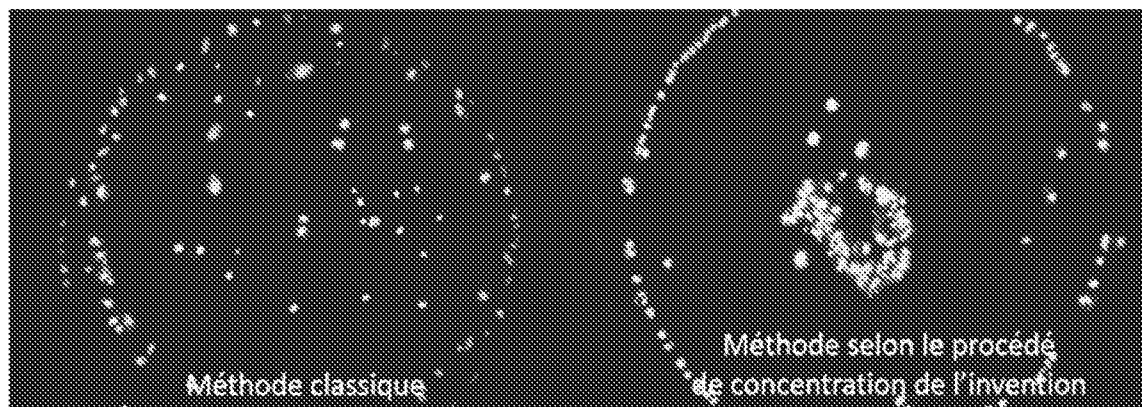


FIG. 6

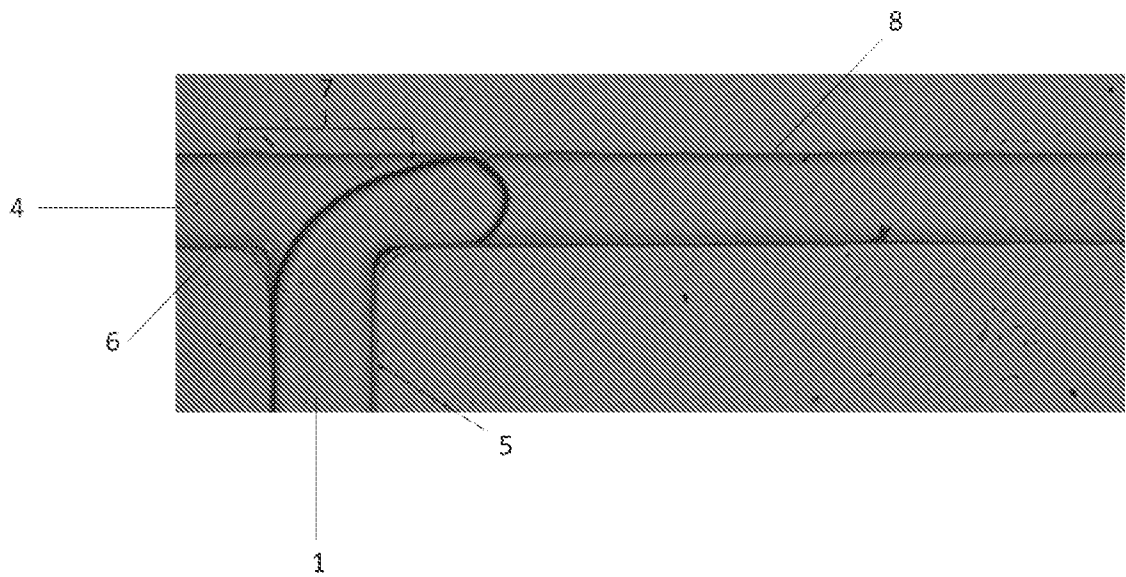


FIG. 7

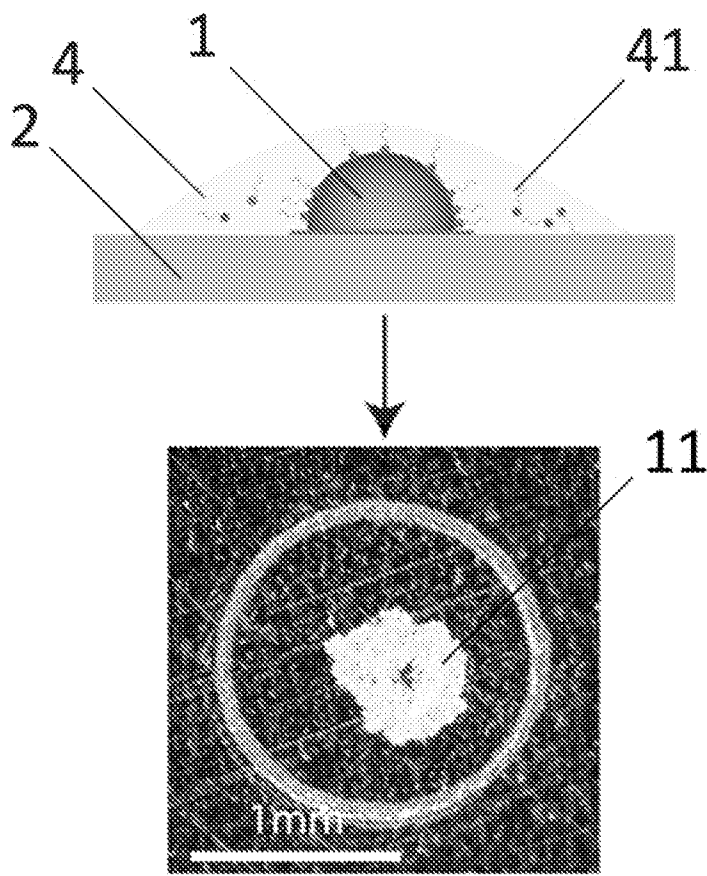


FIG. 8