

(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
24 janvier 2008 (24.01.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/009867 A2

(51) Classification internationale des brevets :
G01R 33/60 (2006.01) **G01N 33/487** (2006.01)
G01N 24/10 (2006.01)

(74) Mandataires : Cabinet Plasseraud etc.; 52 rue de la Vic-
toire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/051704

(22) Date de dépôt international : 20 juillet 2007 (20.07.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0606623 20 juillet 2006 (20.07.2006) FR

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, 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, MT, 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).

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
UNIVERSITE DE PROVENCE AIX MARSEILLE 1
[FR/FR]; 3 place Victor Hugo, F-13331 Marseille Cédex
3 (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**
SCIENTIFIQUE - CNRS - [FR/FR]; 3, rue Michel Ange,
F-75794 Paris Cédex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **CULCASI,**
Marcel [FR/FR]; 18 allée Léo DELIBES Touret de Val-
lier, F-13500 Martigues (FR). **PIETRI, Sylvia** [FR/FR]; 18
allée Léo DELIBES Touret de Vallier, F-13500 Martigues
(FR). **TORDO, Paul** [FR/FR]; 7 bd du Jardin zoologique,
F-13004 Marseille (FR). **GOSSET, Gaëlle** [FR/FR]; 185
parc des Amandiers, F-13170 La Gavotte (FR). **KAROUI,**
Hakim [FR/FR]; 48 avenue de frais vallon Bat E, Appt 541,
F-13013 Marseille (FR).

Déclaration 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

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

(54) Title: METHOD FOR DETECTING, IDENTIFYING AND QUANTIFYING FREE RADICALS, SAMPLING DEVICE
AND KIT FOR THE IMPLEMENTATION THEREOF

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION, IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DE RADICAUX LIBRES, DISPOSITIF
DE PRELEVEMENT ET KIT POUR SA MISE EN OEUVRE

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting, identifying or quantifying free radicals in a biological fluid, in
which a biological fluid is sampled, said biological fluid is immediately mixed with a reactive composition containing a compound
for trapping free radicals, a stabilizer and a nonoxidizing chelating agent, and then the mixture thus obtained is analysed using an
analytical apparatus that detects a compound comprising a free electron, to a device for taking a sample of a biological fluid so as to
immediately introduce it into a mixture with said reactive composition, and to kits for implementing the above method.

(57) Abrégé : Procédé de détection, identification ou quantification de radicaux libres dans un fluide biologique dans lequel on
prélève un fluide biologique, on mélange immédiatement ledit fluide biologique avec une composition réactive renfermant un com-
posé piègeur de radicaux libres, un agent stabilisant et un agent chélatant non oxydant, puis on procède à l'analyse du mélange ainsi
obtenu à l'aide d'un appareil d'analyse détectant un composé comprenant un électron libre, dispositif de prélèvement d'un échantillon
d'un fluide biologique pour l'envoyer immédiatement en mélange avec ladite composition réactive et kits pour la mise en œuvre du
procédé ci-dessus.

WO 2008/009867 A2

PROCEDE DE DETECTION, IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DE RADICAUX LIBRES,
DISPOSITIF DE PRELEVEMENT ET KIT POUR SA MISE EN ŒUVRE

La présente invention concerne un nouveau procédé de détection,
5 identification et quantification de radicaux libres, un dispositif de prélèvement et un kit pour sa mise en œuvre.

Dikalova et al décrivent dans PNAS 98 :13549 et suivantes.(2001) la détection de radicaux CO₂.- dans la bile de rats après leur intoxication au formate de sodium. La nitrone alpha (4- pyridyl-1-oxide)-N-t-butyl nitrone
10 (POBN) est administrée directement chez l'animal par voie intrapéritonéale à la dose de 1,5 g/kg. Le piègeur administré in vivo provoque cytotoxicité et interférences avec les processus radicalaires. De plus les essais in vitro de contrôle n'ont pas permis de détecter l'adduit formé entre la nitrone et l'espèce porteuse de radicaux libres recherchée. L'adduit radicalaire n'a pas plus été
15 détecté en présence de peroxydase de raifort ou de catalase. Kadiiska et al étudient dans The journal of clinical investigation 96 :1653-1657 (1995) la formation in vivo d'espèces radicalaires. Ils décrivent notamment la détection de radicaux hydroxyle dans la bile de rats après intoxication par surcharge de fer et administration directement chez l'animal par voie intrapéritonéale d'alpha
20 phényl-N-t-butyl nitrone (PBN) à la dose 70mg/kg mM).

Il existe actuellement des méthodes indirectes pour la détection, l'identification et la quantification de radicaux libres. On peut citer par exemple la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la spectrophotométrie UV, deux techniques permettant le dosage de produits secondaires oxydés
25 formés lors de la dégradation des lipides ou protéines par les radicaux libres. Il faut savoir que ces produits secondaires ne sont pas nécessairement spécifiques de dégradations d'origine radicalaire, pouvant être obtenus par d'autres voies.

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est la seule
30 technique de détection directe des radicaux libres permettant, sous certaines conditions et dans un délai relativement court (1 à 5 minutes), d'obtenir un résultat sur la nature et la concentration de radicaux libres présents dans un

mélange, par l'obtention d'un signal de résonance (spectre). La seule possibilité d'observer des radicaux centrés sur l'oxygène ou le carbone, hautement instables en milieu aqueux à température ambiante, est d'utiliser la technique de piégeage (spin trapping) consistant à faire réagir le radical instable $R^\bullet$ avec
5 une molécule piège P initialement introduite dans le milieu. Cette réaction donne naissance à un nouveau radical $(PR)^\bullet$ suffisamment stable pour conduire à une observation par RPE ; il est appelé adduit de piégeage et appartient à la famille chimique des nitroxydes. L'analyse du spectre de RPE de l'adduit et la connaissance de la structure chimique de P permettront ensuite de remonter à
10 la nature chimique de $R^\bullet$.

Parmi les nombreux pièges ayant été développés pour la capture spécifique des radicaux libres oxygénés en milieu biologique, les plus performants appartiennent à la famille chimique des *nitrones*. Le 5-diéthoxyphosphoryl-5-méthyl-1-pyrroline *N*-oxyde (DEPMPO) et le 2-
15 ethoxycarbonyl-2,3,4-dihydro-2*H*-pyrrole-1-oxide (EMPO) se sont montrés remarquablement performants dans le piégeage du radical superoxyde, intermédiaire clé des processus radicalaires *in vivo*).

Cependant, dans les conditions usuelles rencontrées en biologie, notamment en présence de nombreux constituants réducteurs de la cellule
20 (ascorbate, thiols) et d'oxygène, les adduits nitroxydes sont rapidement réduits en espèces non radicalaires (diamagnétiques) indétectables par RPE.

Il serait donc souhaitable de disposer d'un procédé de détection, identification et quantification directs de radicaux libres qui donne des résultats conformes à la réalité.

25 Or après de longues recherches les demandeurs ont mis au point un tel procédé et un dispositif pour sa mise en œuvre compte tenu de la nécessité d'effectuer très rapidement un des stades du procédé.

C'est pourquoi la présente demande a pour objet un procédé de détection, identification ou quantification de radicaux libres dans un fluide
30 biologique dans lequel :

- on prélève un fluide biologique,

- on mélange immédiatement ledit fluide biologique avec une composition réactive renfermant un composé piègeur de radicaux libres, un agent stabilisant et un agent chélatant non oxydant, puis
- on procède à l'analyse du mélange ainsi obtenu à l'aide d'un appareil d'analyse détectant un composé comprenant un électron libre, par exemple en utilisant la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE).

Dans la présente demande et dans ce qui suit, le terme «composé piègeur de radicaux libres» désigne un composé capable de réagir avec un radical libre et de le fixer, par exemple une nitrone c'est-à-dire un *N*-oxyde d'imine encore appelé oxyde d'azométhine, notamment une nitrone cyclique, de préférence un analogue de la 5,5-diméthyl-1-pyrroline *N*-oxyde (DMPO) et particulièrement le 5-diéthoxyphosphoryl 5-méthyl-1-pyrroline *N*-oxyde (DEPMPO) ou le 2-ethoxycarbonyl-2,3,4-dihydro-2*H*-pyrrole-1-oxide (EMPO).

La concentration du composé piègeur de radicaux libres lors de l'analyse est avantageusement comprise entre 50 et 300 mM, de préférence comprise entre 50 et 200 mM, notamment comprise entre 50 et 150 mM, tout particulièrement comprise entre 80 et 100 mM.

Le terme «agent stabilisant» désigne un composé présentant une cavité autorisant la formation de complexes d'inclusion, par exemple un composé minéral comme un zéolithe ou une kaolinite, ou organique comme un éther-couronne, un cyclophane, un oligomère cyclique d'un ose tel le glucose, de préférence un oligomère cyclique d'un ose tel le glucose (par exemple une cyclodextrine) ou un éther-couronne, particulièrement une cyclodextrine ou un éther-couronne et tout particulièrement une β -cyclodextrine comme l'éther 2-hydroxypropylique de b $\acute$ ta-cyclodextrine ou la méthyl- b $\acute$ ta -cyclodextrine.

La concentration de l'agent stabilisant lors de l'analyse est avantageusement comprise entre 50 et 300 mM, de préférence comprise entre 50 et 200 mM, notamment comprise entre 50 et 150 mM, tout particulièrement comprise entre 80 et 100 mM. Elle dépendra du composé utilisé et sera de préférence comprise entre 50 et 200 mM, notamment comprise entre 50 et 150 mM, tout particulièrement comprise entre 80 et 100 mM pour la méthyl- β -cyclodextrine (Randomly Methylated- beta -cyclodextrine, RM- beta -CD).

Le terme «immédiatement» signifie le plus rapidement possible, et avantageusement en moins de 10 secondes, de préférence en moins de 5 secondes, notamment en moins de 3 secondes, particulièrement en moins de 2 secondes et tout particulièrement en moins de 1 seconde après le prélèvement.

5 L'agent chélatant est par exemple la deferoxamine, et particulièrement l'acide diéthylène triamine pentacétique (DTPA). L'acide éthylène diamine tétraacétique, qui est oxydant, ne convient par exemple pas.

La concentration de l'agent chélatant est avantageusement comprise entre 0,1 et 2 mM, de préférence comprise entre 0,1 et 1,5 mM,
10 notamment comprise entre 0,2 et 1 mM, tout particulièrement comprise entre 0,5 et 1,0 mM.

On peut citer par exemple, à titre de fluide biologique, les fluides biologiques de mammifères, par exemple d'équidés, notamment d'humains, en particulier le sang, l'urine, la sueur, le sperme, des effluents d'origine biologique
15 comme des perfusats d'organes ou des milieux de culture cellulaire, de préférence le plasma, le sang et le sperme, et notamment ces derniers, tout particulièrement le dernier.

Selon le fluide biologique, la composition réactive peut renfermer d'autres composés. Par exemple, si le fluide biologique est le sang, elle
20 renferme en outre un anticoagulant comme des ions citrate comme dans l'acide citrate dextrose ou de l'héparine.

La quantité de l'agent anticoagulant est avantageusement comprise entre 10 et 100 UI, de préférence comprise entre 10 et 50 UI, notamment comprise entre 10 et 25 UI pour l'héparine. Elle dépendra du
25 composé utilisé et sera par exemple comprise entre des doses produisant un effet anticoagulant équivalent à celui-ci-dessus.

Dans des conditions préférentielles de mise en œuvre du procédé ci-dessus décrit la composition réactive renferme en outre un tampon.

Le tampon utilisé est alors avantageusement un tampon pH 7
30 comme le tampon phosphate, le plus classiquement utilisé. Elle peut renfermer en outre un acide ou une base pour ajuster le pH du milieu.

Dans encore d'autres conditions préférentielles de mise en œuvre du procédé ci-dessus décrit, le mélange de l'échantillon et des réactifs de la composition réactive est congelé avant analyse à l'aide d'un appareil d'analyse détectant un composé comprenant un électron libre.

- 5 Par exemple après prélèvement de l'échantillon, notamment de sang, on peut transférer le prélèvement dans un cryotube et placer ledit tube dans de l'azote liquide.

 Pour procéder ensuite à l'analyse, on décongèle rapidement le mélange et on procède immédiatement à l'analyse. Par exemple on décongèle
10 le mélange en 30 secondes et on procède dans les 30-60 secondes après décongélation au remplissage de la cellule de mesure et de préférence à l'analyse.

 Comme on l'a vu ci-dessus, le mélange de l'échantillon et des réactifs de la composition réactive doit être réalisé immédiatement, le plus
15 rapidement possible.

 Il n'existe aucun dispositif pour mettre facilement en œuvre le procédé ci-dessus dans le cas notamment d'un prélèvement sanguin. Il a donc été conçu spécialement pour la mise en œuvre du procédé ci-dessus un dispositif de prélèvement d'un échantillon pouvant comprendre une seringue, permettant
20 le prélèvement d'un échantillon par exemple le prélèvement *in vivo* d'un échantillon sanguin pour l'envoyer immédiatement en mélange avec la composition réactive sans risque d'injection en retour de l'échantillon mêlé à des réactifs.

 C'est pourquoi la présente demande a aussi pour objet un dispositif
25 de prélèvement d'un échantillon d'un fluide biologique pour l'envoyer immédiatement en mélange avec une composition réactive ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend une chambre d'aspiration dudit échantillon paramétrée pour prélever la quantité d'échantillon nécessaire pour la réaction avec une quantité préétablie de composition réactive ci-dessus, et un dispositif
30 anti-retour.

Dans des conditions préférentielles de mise en œuvre de l'invention, le dispositif de prélèvement ci-dessus comprend une seringue munie d'un dispositif anti-retour.

La présente demande a aussi pour objet un kit pour la mise en œuvre d'un procédé de détection, identification ou quantification de radicaux libres dans un fluide biologique, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif de prélèvement d'un échantillon d'un fluide biologique ci-dessus ainsi qu'un récipient contenant une quantité préétablie de composition réactive ci-dessus, ainsi, optionnellement, qu'un récipient contenant une quantité préétablie d'un composé piègeur de radicaux libres.

Le procédé objet de la présente invention possède de très intéressantes qualités. Il permet notamment de détecter, identifier ou quantifier directement les radicaux libres dans un fluide biologique, in vitro.

Ces qualités sont illustrées ci-après dans la partie expérimentale. Elles justifient l'utilisation des procédés, dispositifs et kits ci-dessus décrits, dans la détermination des radicaux libres comme les radicaux centrés sur l'oxygène (superoxyde, hydroxyle, alkoxyle...) ou le carbone (alkyle..) dans le sang. Par exemple chez l'homme, on obtient ainsi des informations sur la présence d'une inflammation, d'une ischémie, d'un choc septique, l'effet d'un entraînement sportif intensif, etc...

On peut citer aussi la possibilité de tester l'efficacité de médicaments ou de produits ou compositions biologiques comme des milieux de transport ou de conservation de transplants.

C'est pourquoi la présente demande a également pour objet un procédé pour la détermination des radicaux libres comme les radicaux centrés sur l'oxygène (superoxyde, hydroxyle, alkoxyle...) ou le carbone (alkyle..) dans le sang, dans lequel on met en œuvre le procédé ci-dessus sur un échantillon sanguin.

Grâce au dispositif de prélèvement ci-dessus, une analyse est possible aussi bien en laboratoire d'analyses qu'à l'hôpital et il n'est pas nécessaire de se trouver près de l'appareil d'analyse pour bénéficier de celle-ci.

Un prélèvement prêt pour analyse peut attendre avant que l'on procède à l'analyse.

Les conditions préférentielles de mise en œuvre des procédés de détection, identification ou quantification de radicaux libres dans un fluide biologique ci-dessus décrites s'appliquent également aux autres objets de l'invention visés ci-dessus, notamment aux dispositifs de prélèvement d'un échantillon d'un fluide biologique pour l'envoyer immédiatement en mélange avec une composition réactive et aux kits pour la mise en œuvre dudit procédé.

La figure 1 représente les résultats obtenus sur des prélèvements sanguins effectués sur un rat nageur (à raison de 30 min, 3 fois/jour pendant 3 mois) à l'issue de la phase d'exercice. Piégeage avec la DEPMPO (100 mM). A) en présence de méthyl-béta-cyclodextrine (100 mM), spectre enregistré 35 sec après prélèvement; B) en présence de méthyl-béta-cyclodextrine (100 mM) et après congélation de l'échantillon dans l'azote liquide pendant 3 jours, spectre enregistré 35 sec après décongélation; C) en absence de méthyl-béta-cyclodextrine, spectre enregistré 35 sec après décongélation.

La figure 2 représente les résultats obtenus sur des prélèvements sanguins effectués sur un rat nageur (à raison de 30 min, 3 fois/jour pendant 3 mois) à l'issue de la phase d'exercice. Piégeage avec la DEPMPO (100 mM) en présence de méthyl-béta-cyclodextrine (100 mM). Congélation de l'échantillon dans l'azote liquide pendant 3 jours, A) spectre enregistré 35 sec après décongélation; B) spectre enregistré 1min 30 sec après décongélation; C) spectre enregistré 2 min 30 sec après décongélation; D) spectre enregistré 3 min 30 sec après décongélation.

La figure 3 représente les résultats obtenus sur des prélèvements sanguins effectués sur un cœur de rat reperfusé avec du sang après conservation du greffon pendant 5 heures dans du liquide cardioplégique. A) Arrêt et conservation dans du Ringer lactate; B) Arrêt et conservation dans Celsior®.

Piégeage avec la DEPMPO (150 mM) en présence de méthyl-béta-cyclodextrine (120 mM).

La figure 4 représente les résultats obtenus sur des prélèvements sanguins veineux effectués chez un patient âgé, atteint de la maladie d'Alzheimer et présentant des signes de démence, recruté dans le cadre d'un essai clinique. Piégeage avec la DEPMPO (100 mM) en présence de méthyl-béta-cyclodextrine (100 mM); A) spectre enregistré 35 sec après décongélation; B) spectre enregistré 2 min 30 sec après décongélation; C) spectre enregistré 3 min 30 sec après décongélation.

Les exemples qui suivent illustrent la présente demande.

Exemple 1 : Tube pour analyse

On a réalisé un tube pour analyse sanguine en installant dans un cryotube de 1,8 ml un aliquote de 0,25 ml d'une composition ayant la composition molaire suivante :

DTPA	2,4 mM
Héparine sodique	30 UI (ou 6 μ L)
Méthyl- β -cyclodextrine	480 mM
Tampon phosphate (pH7)	240 mM

Le pH du tampon phosphate a été préalablement ajusté à 7, avec une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium.

On a prévu séparément un flacon contenant 5 ml de DEPMPO (600 mM dans l'eau distillée).

Exemple 2 : Tube pour analyse prêt à l'emploi

On ajoute au tube pour analyse sanguine de l'exemple 1, 0,25 ml de la solution de DEPMPO dans l'eau distillée.

On a donc la composition réactive finale suivante :

DTPA	1,2 mM
Héparine sodique	15 UI (ou 3 μ L)
Méthyl- β -cyclodextrine	240 mM
Tampon phosphate	120 mM
DEPMPO	300 mM
Eau distillée	0,5 ml

Exemple 3 : Seringue pour analyse

- 5 On a réalisé une seringue pour analyse sanguine en installant dans une seringue dont la chambre d'aspiration est de 2 ml et munie d'un dispositif anti-retour, 0,25 ml d'une composition dosée comme indiqué à l'exemple 1.

Exemple 4 : Kit pour analyse

- 10 On a réalisé un kit pour analyse sanguine en prévoyant dans un emballage, une seringue pour analyse sanguine de l'exemple 3 et un flacon contenant 0,25 ml de DEPMPO (600 mM dans l'eau distillée).

Exemple 5 : Dosage des radicaux libres dans un échantillon

- 15 sanguin in vivo chez le rat.

On aspire le contenu du tube pour analyse prêt à l'emploi de l'exemple 2 dans une seringue de 2 ml. On prélève grâce à la même seringue 1 ml de sang dans l'artère fémorale d'un rat anesthésié à l'issue d'une période d'entraînement sportif (nage) de 30 min faisant partie d'un programme intensif

20 (à raison de 30 min, 3 fois/jour pendant 3 mois).

La composition finale des réactifs dans cet échantillon est la suivante :

DTPA	0,2 mM
Héparine sodique	5 UI (ou 1 μ l)
Méthyl- β -cyclodextrine	80 mM
Tampon phosphate	40 mM
DEPMPO	100 mM
Eau distillée	0,5 ml
Sang	1 ml

On transfère le mélange dans une cellule plate en quartz, puis dans l'entrefer de l'aimant d'un spectromètre de RPE (Bruker ESP 300).

On procède immédiatement (dans les 30-60 secondes après le
5 prélèvement et le remplissage de la cellule de mesure en quartz) à l'analyse à 25°C dans les conditions suivantes :

Fréquence micro-onde : 9,79 GHz
Puissance micro-onde : 10 mW
10 Amplitude de modulation : 0,198 Gauss
Fréquence de modulation : 100 kHz
Gain du récepteur : 1×10^5
Constante de temps : 40,96 ms
Etendue de balayage en champ : 130 Gauss
15 Vitesse de balayage en champ : 3,1 Gauss/s

On obtient le spectre de la figure 1 A.

Dans le prélèvement analysé par RPE, on peut observer que
l'exercice physique intensif se traduit par une production intense de radicaux
20 libres, ce qui avait déjà été signalé par d'autres méthodes, indirectes.

Exemple 6 : Dosage des radicaux libres dans un échantillon sanguin *in vivo* après congélation dans l'azote liquide et décongélation.

On procède comme à l'exemple 5, mais après prélèvement du sang, on transfère le contenu de la seringue dans un cryotube et on place le
5 tube dans l'azote liquide.

On décongèle le mélange (en 30 secondes) 3 jours après l'avoir placé dans l'azote liquide et on procède immédiatement (dans les 30-60 secondes après décongélation et remplissage de la cellule de mesure en quartz) à l'analyse dans les conditions de l'exemple 5.

10 On obtient un spectre représenté en figure 1B, semblable qualitativement à celui de la figure 1A. On précise que les comparaisons entre les spectres ne peuvent être effectuées que lorsque ces spectres ont été enregistrés au même moment après prélèvement ou décongélation. La figure 2 (A à D) montre que la décroissance du signal est cependant faible dans un
15 délai raisonnable (3 min 30 secondes au minimum) après décongélation de l'échantillon, ceci permettant de l'enregistrer de manière reproductible.

De manière surprenante, on peut donc congeler le prélèvement avant analyse.

20 Exemple de comparaison: Utilisation d'une composition réactive sans agent stabilisant dans un échantillon sanguin *in vivo*

On procède comme à l'exemple 5, mais le tube pour analyse sanguine de l'exemple 1 ne renferme pas de méthyl- β -cyclodextrine.

25 On obtient le spectre de la figure 1C.

On peut observer qu'aucun signal de RPE ne peut être détecté dans ces conditions.

La stabilisation est donc nécessaire.

Exemple 7 : Dosage des radicaux libres dans un échantillon sanguin obtenu dans un modèle *in vitro*.

On aspire le contenu du tube pour analyse prêt à l'emploi de l'exemple 2 dans une seringue de 2 ml. On prélève grâce à la même seringue
5 0,5 ml de sang après canulation et aspiration dans le sinus coronaire d'un cœur de rat dans les conditions suivantes.

Le prélèvement sanguin est effectué dans le sinus coronaire d'un cœur de rat qui a été préalablement isolé et perfusé puis soumis au protocole expérimental suivant :

- 10 - une période de contrôle normoxique de 30 min avec une solution de Krebs-Henseleit (37°C, pH 7.35 ; 2.5 mM CaCl₂, 10 mM glucose),
- un arrêt cardioplégique à 4°C réalisé d'une part par la solution cardioplégique classique de l'Hôpital Saint-Thomas d'autre part par une solution de type Celsior® contenant des agents antiradicalaires (voir Pietri et
15 al (1994) Transplantation 58(6): 739; Ménasché et al. (1994) Eur. J. Cardiothorac. Surg. 8: 207).
- une période de conservation de 5 heures en solution cardioplégique.
- une reperfusion de 1 minute avec du sang de rat, au cours de laquelle le
20 prélèvement est effectué dans le sinus coronaire, additionné au mélange piègeur + stabilisant (seringue de l'exemple 2), puis congelé dans l'attente de l'expérience de RPE.

La composition finale des réactifs dans cet échantillon est la suivante :

DTPA	1.2 mM
Héparine sodique	7.5 UI (ou 1.5 μ L)
Méthyl- β -cyclodextrine	120 mM
Tampon phosphate	60 mM
DEPMPO	150 mM
Eau distillée	0,5 ml
Sang	0,5 ml

Le mélange est immédiatement congelé dans l'azote liquide. Après décongélation (effectuée en 30 secondes), on transfère le mélange dans une cellule plate en quartz, puis dans l'entrefer de l'aimant d'un spectromètre de RPE (Bruker ESP 300).

On procède immédiatement (dans les 30-60 secondes après la décongélation et le remplissage de la cellule de mesure en quartz) à l'analyse dans les conditions suivantes :

10

Fréquence micro-onde : 9,79 GHz
 Puissance micro-onde : 10 mW
 Amplitude de modulation : 0,198 Gauss
 Fréquence de modulation : 100 kHz

15

Gain du récepteur : 1×10^5
 Constante de temps : 40,96 ms
 Etendue de balayage en champ : 130 Gauss
 Vitesse de balayage en champ : 3,1 Gauss/s

20

On obtient les spectres de la figure 3 (A et B).

Le spectre de la figure 3A correspond à un prélèvement effectué dans un cœur de rat qui a été arrêté puis conservé dans la solution cardioplégique de Saint-Thomas; le spectre de la figure 3B correspond à un prélèvement effectué dans un cœur de rat qui a été arrêté puis conservé dans

25

la solution cardioplégique de type Celsior®. Les deux spectres ont été enregistrés 35 secondes après la décongélation. On observe que des radicaux sont produits à la reperfusion post-ischémique en présence de sang (Figure 3A) et que la conservation du greffon dans une solution antiradicalaire inhibe cette
5 production.

Par ailleurs, des résultats antérieurs ont montré que la présence d'agents antiradicalaires améliore significativement la récupération postischémique cardiaque (voir Pietri et al (1994) Transplantation 58(6): 739; Ménasché et al. (1994) Eur. J. Cardiothorac. Surg. 8: 207), soulignant ainsi
10 l'intérêt de la détection des radicaux libres.

Exemple 8 : Dosage des radicaux libres dans un échantillon sanguin *in vivo* chez l'homme.

15 Le prélèvement sanguin veineux a été réalisé chez des patients âgés, atteints de la maladie d'Alzheimer et présentant des signes de démence, recrutés dans le cadre d'un essai clinique.

On aspire le contenu du tube pour analyse prêt à l'emploi de l'exemple 2 dans une seringue de 2 ml. On prélève grâce à une seringue stérile
20 séparée 3 ml de sang veineux d'un patient ci-dessus, et on transfère immédiatement le sang prélevé dans un tube à hémolyse hépariné. Immédiatement, 1 ml de ce sang est aspiré dans la seringue de 2 ml contenant le mélange piègeur + stabilisant préalablement installé puis congelé dans l'azote liquide dans l'attente de l'expérience de RPE.

25 La composition finale des réactifs dans cet échantillon est la suivante :

DTPA	0,2 mM
Héparine sodique	5 UI (ou 1 μ L)
Méthyl- β -cyclodextrine	80 mM
Tampon phosphate	40 mM
DEPMPO	100 mM
Eau distillée	0,5 mL
Sang	1 ml

Après décongélation, le mélange est transféré dans une cellule plate en quartz, puis dans l'entrefer de l'aimant d'un spectromètre de RPE (Bruker ESP 300).

- On procède immédiatement (dans les 30-60 secondes après la
- 5 décongélation et le remplissage de la cellule de mesure en quartz) à l'analyse par RPE dans les conditions suivantes :

- Fréquence micro-onde : 9,79 GHz
- Puissance micro-onde : 10 mW
- 10 Amplitude de modulation : 0,198 Gauss
- Fréquence de modulation : 100 kHz
- Gain du récepteur : 1×10^5
- Constante de temps : 40,96 ms
- Etendue de balayage en champ : 130 Gauss
- 15 Vitesse de balayage en champ : 3,1 Gauss/s

On obtient les spectres de la figure 4 (A, B, C) enregistrés à différents temps suivant la décongélation (35 sec, 2 min 30 sec, 3 min 30 sec)

- 20 Les spectres obtenus montrent l'existence de radicaux libres dans les prélèvements issus de cette population de patients et souligne l'intérêt de cette technique de détection pour des études à visée clinique et thérapeutique.

- D'autres essais effectués chez le rat ont montré la possibilité de
- 25 dosages sur le sperme, pouvant être utilisés pour étudier le problème de l'infertilité masculine.

REVENDICATIONS

1. Un procédé de détection, identification ou quantification de radicaux libres dans un fluide biologique dans lequel :
 - 5 - on prélève un fluide biologique,
 - on mélange immédiatement ledit fluide biologique avec une composition réactive renfermant un composé piègeur de radicaux libres, un agent stabilisant et un agent chélatant non oxydant,
 - puis on procède à l'analyse du mélange ainsi obtenu à l'aide d'un appareil
 - 10 d'analyse détectant un composé comprenant un électron libre.
2. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'analyse du mélange est effectuée par résonance paramagnétique électronique (RPE).
3. Un procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le
- 15 composé piègeur de radicaux libres est une nitrone.
4. Un procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le composé piègeur de radicaux libres est une nitrone choisie parmi le 5-diéthoxyphosphoryl 5-méthyl-1-pyrroline N-oxyde (DEPMPO) et le 2-ethoxycarbonyl-2-3,4-dihydro-2H-pyrrole-1-oxide (EMPO).
- 20 5. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la concentration du composé piègeur de radicaux libres lors de l'analyse est comprise entre 50 et 200 mM.
6. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'agent stabilisant est une cyclodextrine.
- 25 7. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la concentration de l'agent stabilisant lors de l'analyse est comprise entre 50 et 200 mM.
8. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'on mélange le fluide biologique avec la composition réactive renfermant un
- 30 composé piègeur de radicaux libres, un agent stabilisant et un agent chélatant non oxydant en moins de 10 secondes après le prélèvement.

9. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'agent chélatant qui n'est pas oxydant est l'acide diéthylène triamine pentacétique.

10. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la concentration de l'agent chélatant est comprise entre 0,1 et 1,5 mM.

11. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le fluide biologique est choisi parmi le sang, l'urine, la sueur, des perfusats d'organes et des milieux de culture cellulaire humains.

12. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la composition réactive renferme en outre un anticoagulant.

13. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la composition réactive renferme en outre un tampon.

14. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le mélange de l'échantillon et des réactifs de la composition réactive est congelé avant analyse à l'aide de l'appareil d'analyse.

15. Un dispositif de prélèvement d'un échantillon d'un fluide biologique pour l'envoyer immédiatement en mélange avec une composition réactive telle que définie à l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend une chambre d'aspiration dudit échantillon paramétrée pour prélever la quantité d'échantillon nécessaire pour la réaction avec une quantité préétablie de composition réactive ci-dessus, et un dispositif anti-retour.

16. Un kit pour la mise en œuvre d'un procédé tel que défini à l'une des revendications 1 à 14 de détection, identification ou quantification de radicaux libres dans un fluide biologique, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif de prélèvement d'un échantillon d'un fluide biologique tel que défini à la revendication 14 ainsi qu'un récipient contenant une quantité préétablie de composition réactive telle que définie à l'une des revendications 1,3,4,5,6,7,8,9,10,12 et 13.

17. Un kit selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un récipient contenant une quantité préétablie d'un composé piègeur de radicaux libres.

18. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que l'on prélève le fluide biologique et mélange immédiatement le fluide biologique avec la composition réactive à l'aide d'un dispositif de prélèvement tel que défini à la revendication 15.

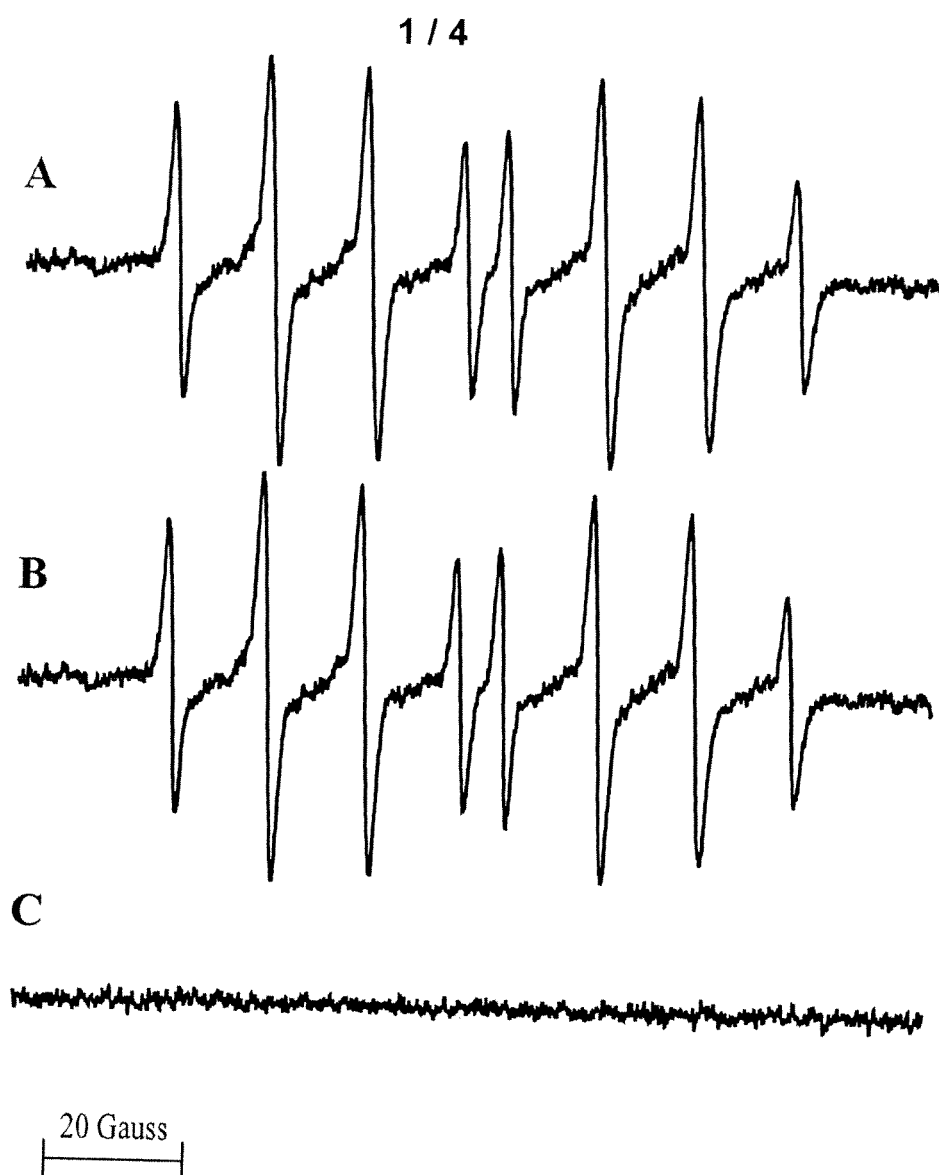


Fig. 1

2 / 4

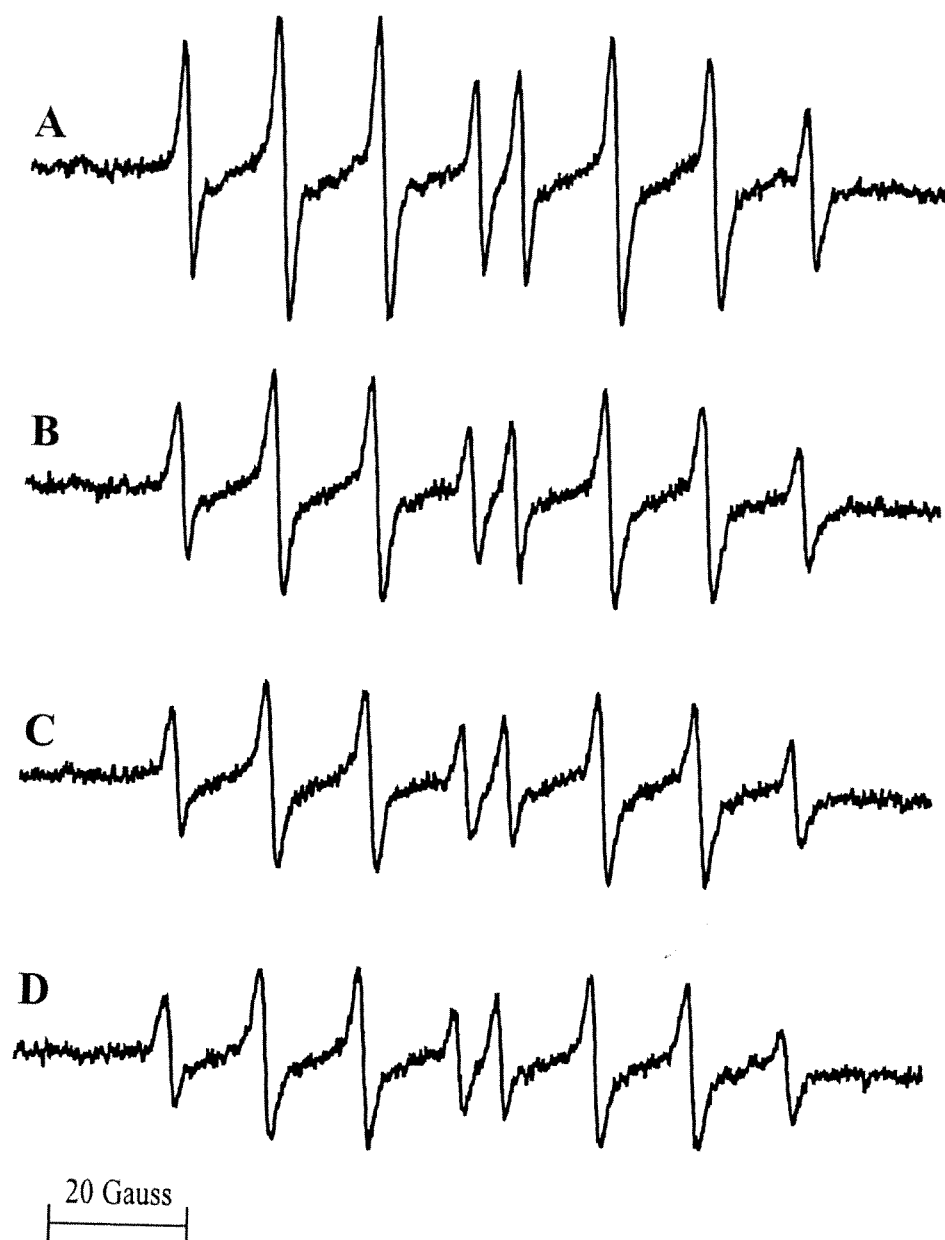


Fig. 2

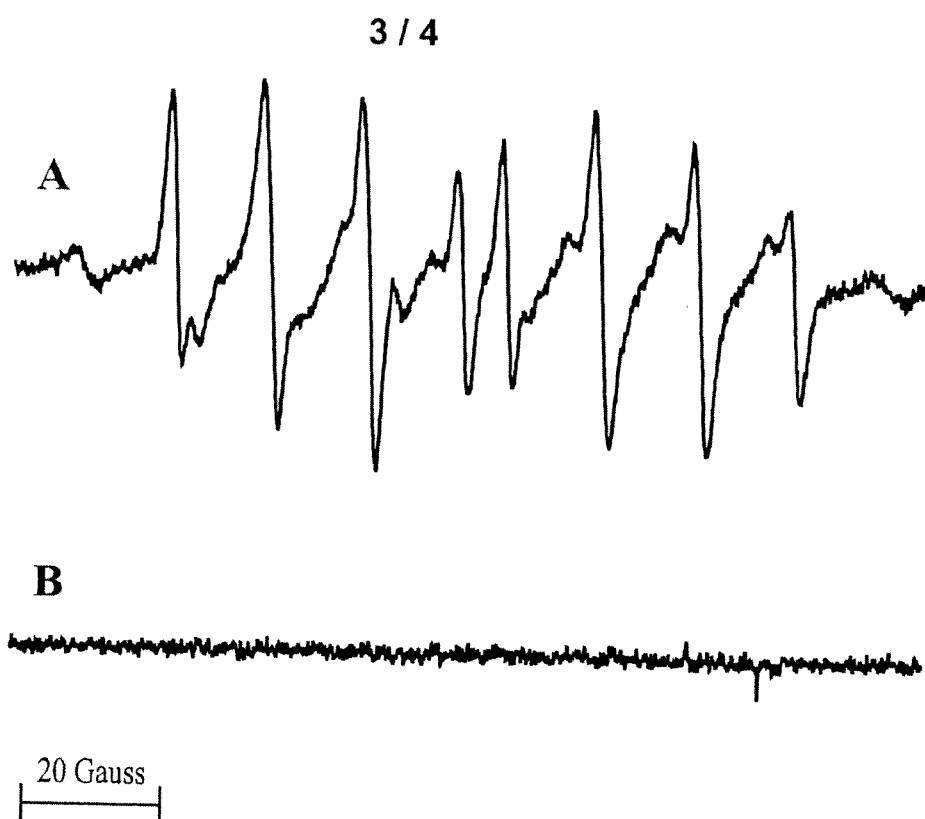


Fig. 3

4 / 4

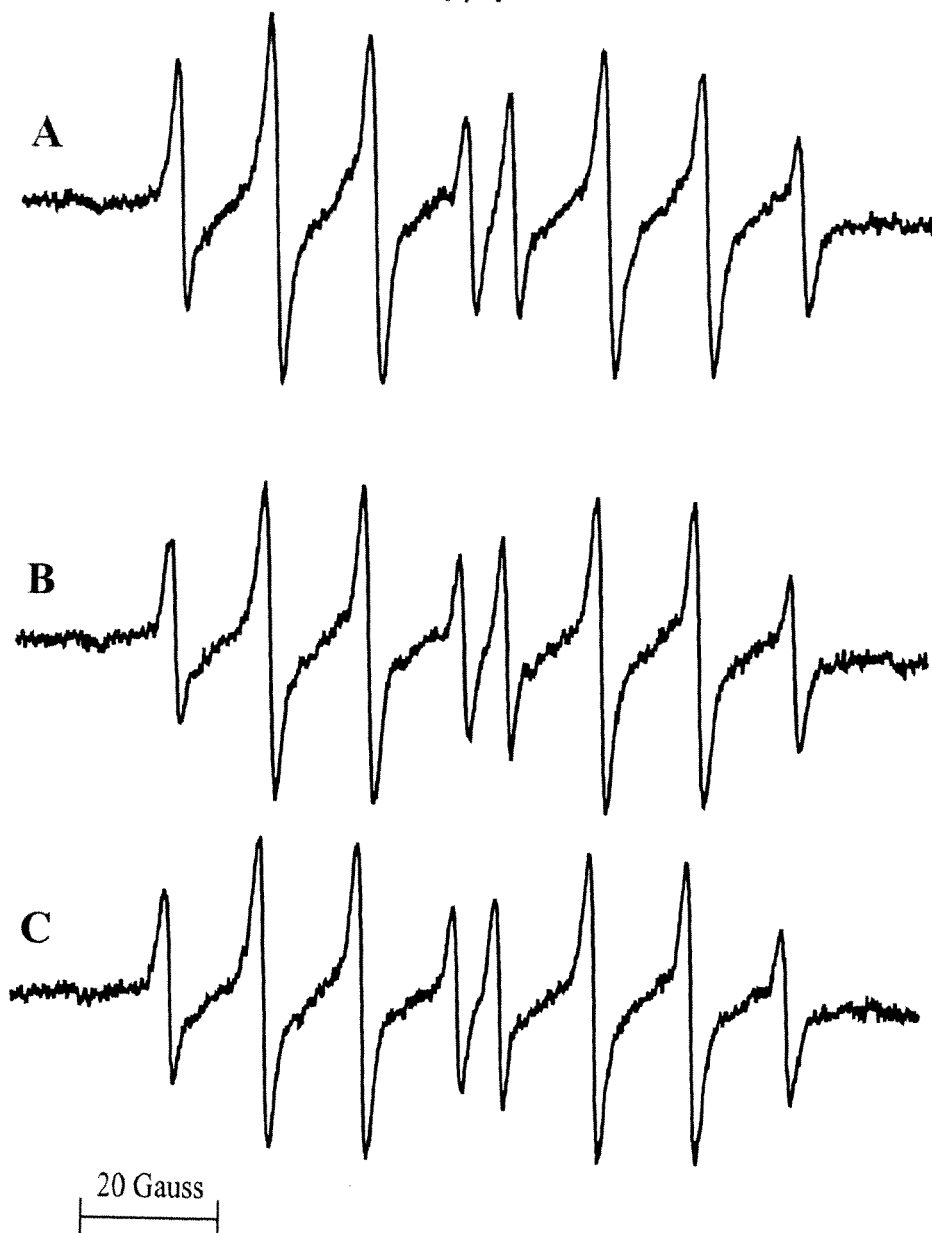


Fig. 4