

(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  
10 août 2006 (10.08.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2006/082344 A1**

(51) Classification internationale des brevets :  
A61B 10/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2006/050089

(22) Date de dépôt international : 2 février 2006 (02.02.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0550303 2 février 2005 (02.02.2005) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : COM-  
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];  
31-33 Rue De La Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **CAILLAT, Patrice** [FR/FR]; 8 Rue De La Mure, F-38000 Grenoble (FR). **MARTIN, Franck** [FR/FR]; 31, rue des chasseurs, Résidence Saint Hubert, Appt 43 Bât. B, F-34070 Montpellier (FR). **COSNIER, Marie-Line** [FR/FR]; 28 bis, rue Ampère, F-38000 Grenoble (FR).

(74) Mandataire : **LEHU, Jean**; BREVATOME, 3, Rue Du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

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

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

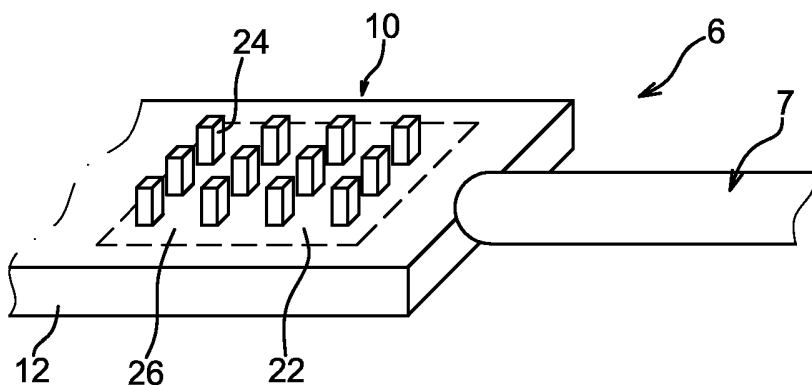
Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

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

(54) Title: DEVICE FOR CONTACT MOLECULAR SAMPLING

(54) Titre : DISPOSITIF DE PRELEVEMENT MOLECULAIRE PAR CONTACT



(57) Abstract: The invention concerns a device (6) for sampling molecules of biological interest. Said device (6) comprises capturing zones (10) whereof the developed surface is much greater than the surface such that the contact sampling enables a sufficient amount of molecules to be obtained to achieve a reliable analysis, while being of dimensions such that the device (6) is neither invasive nor aggressive. In particular the device comprises stepped capture zones (10) localized on a support (12)

made according to microtechnology techniques; the capture zones (10) can advantageously be functionalized.

(57) Abrégé : Un dispositif (6) de prélèvement de molécules d'intérêt biologique est décrit. Le dispositif (6) comprend des zones de capture (10) dont la surface développée est très supérieure à la surface de sorte que le prélèvement par contact permet d'obtenir une quantité suffisante de molécules pour aboutir à une analyse fiable, tout en étant de dimensions telles que le dispositif (6) n'est ni invasif, ni agressif. En particulier, le dispositif comprend des zones de captures (10) étagées localisées sur un support (12) manufacturé selon des techniques de microtechnologie ; les zones de capture (10) peuvent avantageusement être fonctionnalisées.

WO 2006/082344 A1

**DISPOSITIF DE PRELEVEMENT MOLECULAIRE PAR CONTACT****DESCRIPTION****DOMAINE TECHNIQUE**

L'invention concerne le domaine du  
5 diagnostic clinique et/ou du suivi thérapeutique non  
invasifs. Plus particulièrement, l'invention se  
rapporte à un dispositif microscopique de prélèvement  
de molécules d'intérêt biologique par contact, qui ne  
nécessite pas d'ablation ni de biopsie, et dont  
10 l'architecture est telle que son insertion ne cause pas  
de dommage au tissu environnant. L'invention est  
notamment adaptée à la protéomique ou la génomique.

L'invention concerne également un procédé  
permettant la détermination de la composition protéique  
15 des différentes couches d'un tissu. En particulier, ce  
procédé est adapté à la cartographie de tumeurs, par  
exemple dans le cerveau.

**ÉTAT DE LA TECHNIQUE ANTÉRIEURE**

Tout comme la chirurgie tend à être de  
20 moins en moins invasive, les techniques de diagnostic  
clinique et de suivi thérapeutique tendent à la  
miniaturisation des outils nécessaires aux divers  
prélèvements et contrôles.

Les progrès de l'imagerie ont fortement  
25 contribué à cette évolution à travers, par exemple,  
deux voies, en particulier en oncologie :  
amélioration de la limite de détection de tumeurs  
cancéreuses, aide accrue pour le chirurgien grâce à

l'utilisation systématique de méthodologies de repérage et d'assistance au positionnement.

Parallèlement, la biologie moléculaire, que ce soit au niveau de la génomique ou de la protéomique, est de plus en plus associée à l'établissement d'un diagnostic. En fait, il est envisagé de remplacer dans certains cas l'œil de l'anatomopathologiste par une méthode d'analyse moléculaire, et de nombreux développements ont lieu dans les domaines de la protéomique et de l'analyse de masse associée pour identifier et caractériser des marqueurs biologiques.

Il n'en reste pas moins que la méthode de prélèvement des molécules cibles est cruciale. Or les outils existants permettant de faire de l'analyse moléculaire sont tous basés sur le principe de la biopsie, c'est-à-dire sur le prélèvement de cellules ou de tissus plus ou moins entiers, qui seront analysés *ex situ*. Ces techniques altèrent donc l'intégrité biologique ; de plus, elles ne peuvent pas toujours être utilisées, d'autant plus que l'insertion même d'un dispositif de prélèvement doit être minimale dans certaines régions, en particulier par exemple dans le cerveau.

#### **EXPOSÉ DE L'INVENTION**

L'invention sous l'un de ses aspects vise à pallier les inconvénients des dispositifs de prélèvement existants.

L'empreinte moléculaire est une nouvelle approche. Elle consiste à non plus extraire des tissus de la zone d'intérêt mais à simplement y apposer

l'outil de prélèvement. Par contact, sur une surface associée adaptée, de nombreuses molécules, comme les protéines, se retrouvent piégées sur l'outil et peuvent ensuite être désorbées et analysées *ex situ*.

5 L'invention se propose donc d'utiliser le simple contact pour le prélèvement de molécules d'intérêt biologique : une empreinte du tissu est obtenue sur un dispositif selon l'invention, et les molécules ainsi récupérées dans une zone de capture du  
10 dispositif peuvent être analysées. En particulier, comme la taille du dispositif, habituellement plan, est réduite, la surface développée de la zone de capture du dispositif selon l'invention est augmentée de sorte que la quantité de molécules cibles piégées soit suffisante  
15 pour permettre une analyse ultérieure efficace.

Le dispositif de prélèvement selon l'invention comprend ainsi un support ayant au moins une zone de capture moléculaire sur une face. La zone de capture est telle que sa surface développée est au  
20 moins trois fois plus grande que sa surface en vue de dessus ; le rapport entre les surfaces développée et projetée peut atteindre un facteur vingt, voire plus.

Au vu de son utilisation, le dispositif selon l'invention est de taille restreinte et notamment  
25 « microtechnologique », c'est-à-dire que sa section, microscopique, inférieure à 1 mm × 1 mm, peut être réalisée par des procédés utilisés en microtechnologie. En particulier, par « microtechnologique », il faut comprendre que la section d'insertion du dispositif  
30 selon l'invention n'excède pas 1 mm<sup>2</sup> et de préférence, il est inclus dans un cylindre de diamètre 800 µm, par

exemple il est à section parallélépipédique de l'ordre de 300 à 600  $\mu\text{m}$  sur 100 à 300  $\mu\text{m}$ .

Le support peut comprendre une autre zone de capture sur une face opposée à la première.

5                   Avantageusement, le dispositif selon l'invention comprend, sur une face ou les deux, plusieurs zones de capture étagées, c'est-à-dire séparées par des zones d'intervalle définies de préférence matériellement. Ainsi, il est possible  
10 d'analyser les molécules présentes à différentes profondeurs dans le tissu où le dispositif a été inséré.

De préférence, le dispositif est sécable entre les différentes zones de capture. Par exemple,  
15 des moyens de séparation, comme des encoches obtenues par gravure partielle du support, sont présents dans les zones d'intervalle.

Différents modes de réalisation sont prévus pour les zones de capture. Les zones de capture  
20 comprennent une paroi de fond, qui peut délimiter une cavité. Pour augmenter la surface développée, la paroi de fond peut servir de base à la mise en place de microbilles, qui y sont maintenues par une membrane semi-perméable, et/ou présenter des protubérances.

25                   Pour réaliser ces protubérances, les techniques microtechnologiques, de gravure sur silicium par exemple, ou de moulage plastique sont possibles, afin de créer par exemple des réseaux organisés de colonnes carrées, hexagonales ou octogonales de 3 à  
30 50  $\mu\text{m}$  ou 80  $\mu\text{m}$ , par exemple entre 5 et 20  $\mu\text{m}$ , de côté

et de hauteur comprise entre 10 et 400  $\mu\text{m}$ , par exemple de l'ordre de 50  $\mu\text{m}$ .

De façon avantageuse, les zones de capture sont fonctionnalisées, c'est-à-dire que les parois du support et/ou les microbilles sont associées à des marqueurs, qui peuvent porter des fonctions d'affinité des molécules d'intérêt ou être utilisés pour une saturation des espèces majoritaires, auquel cas l'utilisation de billes possédant des ligands spécifiques aux espèces majoritaire et minoritaire est préférée.

Le dispositif selon l'invention est de préférence associé à une tige de manipulation et un manchon de guidage qui permettent de le positionner avec précision au sein du tissu à analyser. En particulier, le manchon peut comprendre des moyens qui permettent de ne mettre les zones de capture en contact avec le milieu environnant que lorsque le dispositif est en place.

Sous un autre aspect, l'invention concerne un procédé permettant de réaliser une cartographie ou une analyse différenciée selon la profondeur de la zone cible. Un dispositif possédant plusieurs zones de capture étagées est inséré dans le tissu à analyser, un prélèvement par contact est effectué, et les molécules prélevées par les différentes zones de capture sont analysées séparément.

Pour réaliser les analyses, les zones de capture peuvent être séparées les unes des autres par section du dispositif, ou le support des zones de

capture peut être utilisé dans l'appareillage de mesure.

#### **BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS**

Les caractéristiques et avantages de l'invention seront mieux compris à la lecture de la description qui va suivre et en référence aux dessins annexés, donnés à titre illustratif et nullement limitatifs.

La figure 1 représente un système de prélèvement par contact selon un mode de réalisation de l'invention.

La figure 2 montre un mode de réalisation d'une zone de capture pour un dispositif selon l'invention.

Les figures 3A et 3B montrent, en coupe, un autre mode de réalisation d'une zone de capture pour un dispositif selon l'invention.

La figure 4 présente un autre mode de réalisation d'une zone de capture pour un dispositif selon l'invention.

La figure 5 montre une fonctionnalisation de la surface du dispositif.

Les figures 6A à 6C montrent différents types de fonctionnalisation par billes.

Les figures 7 montrent différents modes de réalisation de moyens pour séparer les zones de capture d'un dispositif selon l'invention.

La figure 8 présente un procédé d'utilisation d'un dispositif selon l'invention pour une cartographie.

La figure 9 montre les résultats d'une analyse par un dispositif selon l'invention (B) et fonctionnalisé (A).

#### **EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS**

5                    La biochimie moléculaire, par exemple la génomique ou surtout la protéomique, à savoir l'étude des ensembles de protéines, permet d'analyser des composants individuels d'intérêt, en particulier biologique.

10                    Ainsi, un système de prélèvement 1 selon l'invention, schématisé en figure 1, peut comprendre un manchon de guidage 2, par exemple un cathéter : le guide 2 permet entre autres de définir la voie de passage du dispositif de prélèvement. On peut en

15                    particulier le mettre en place, éventuellement sous contrôle optique ou radiologique, préalablement dans la zone cible 3, par exemple une tumeur ou un tissu, *in vivo* ou déjà prélevée, par exemple par biopsie. Avantageusement, la partie d'extrémité 4 du guide 2 est

20                    munie de moyens d'obturation 5 qui protègent le dispositif de prélèvement 6 lors de son insertion et permettent de le mettre en contact avec le tissu d'intérêt 3 une fois en place. Dans le cadre de l'invention, les moyens d'obturation 5 sont de

25                    préférence localisés le long de l'axe longitudinal du guide 2 dont l'extrémité distale est fermée. Les moyens d'obturation 5 peuvent par exemple être une fenêtre rotative ou coulissante, ou une membrane résorbable partiellement.

Le dispositif de prélèvement 6 comprend avantageusement une tige de manipulation 7, dont la longueur dépend de l'utilisation et de la profondeur d'insertion, et qui peut coulisser dans le guide 2. La  
5 partie d'extrémité 8 de la tige 7 est destinée au prélèvement proprement dit. Avantageusement, le guide 2 et donc la tige de manipulation 7 ont un diamètre très faible de façon à ne pas altérer le tissu 3, et à permettre des interventions non invasives chez un  
10 patient. Ainsi, la tige 7 peut avoir un diamètre restreint à quelques millimètres, voire 100  $\mu\text{m}$  ; le guide 2 a un diamètre externe voisin du diamètre de la tige 7. La tige peut, par exemple, être en acier inoxydable chirurgical.

15 Cependant, pour des analyses fines et précises de composés présents de façon minoritaire dans la zone d'intérêt 3, comme des molécules, la quantité de fluide prélevé doit être suffisante pour permettre l'extraction d'informations quant à la nature  
20 tissulaire. En particulier, l'utilisation d'une simple aiguille 7 de petit diamètre ne permet pas une analyse ultérieure efficace en raison de la faible quantité de molécules cibles piégées sur sa surface, qui est réduite même si un usinage est réalisé. Or selon  
25 l'invention, le système de prélèvement 1 peut être utilisé sans restriction, en particulier également dans le cerveau, et donc le dispositif 6 est inclus dans un cylindre de diamètre de l'ordre de 995  $\mu\text{m}$ , voire moins.

Selon l'invention, la partie d'extrémité 8  
30 du dispositif de prélèvement 6 possède au moins une zone de capture 10 dont la surface développée est très

supérieure à la surface normale, de 3 à plus de 20 fois, ce qui permet de diminuer la taille du dispositif 6 tout en maintenant le prélèvement dans des proportions adéquates.

5 Le dispositif de prélèvement 6 comprend ainsi un support 12 qui est de préférence indépendant de la tige de manipulation 7 à l'extrémité de laquelle il peut être solidarisé, par exemple par collage de préférence par une colle biocompatible. Ceci permet  
10 notamment de séparer les procédés de fabrication des deux parties de manipulation et de prélèvement, et d'utiliser une tige biocompatible 7 classique de faible coût. Le support 12 est fabriqué de préférence en un matériau biocompatible, notamment le silicium tel que  
15 précisé plus loin ; les différents éléments composant le manchon de guidage 2 sont eux aussi compatibles avec un usage biologique et/ou médical, par exemple en or ou en plastique,...

Le support 12 peut être de forme  
20 quelconque, mais avantageusement il est plan, sous forme de plaque, tel qu'il apparaîtra à la description des procédés de fabrication. Quoi qu'il en soit, on peut définir sur le support 12 une première face 14 et une deuxième face opposée 16 : dans le cas d'un support  
25 12 non plan, les termes « face » et « face opposée » désignent des portions de la surface externe du support 12 qui sont symétriques par rapport à un plan sécant du support 12. Avantageusement, les faces 14, 16 sont comprises dans un support 12 qui fait de l'ordre de 1 à  
30 3 cm de long (dans le sens de la tige) sur une largeur

de 300 à 800  $\mu\text{m}$ , pour une épaisseur de l'ordre de 200 à 400  $\mu\text{m}$ .

La première face 14 du support 12 est munie d'une zone de capture 10 ; il est préférable que la zone de capture 10 laisse une partie proximale d'extrémité 8 suffisamment longue, par exemple de 2 à 5 mm, pour permettre une solidarisation aisée avec la tige 7. Ainsi, un mode de réalisation préféré P concerne un support 12 en silicium, rectangulaire de dimensions 300  $\mu\text{m}$   $\times$  600  $\mu\text{m}$   $\times$  2 cm, la zone structurée commençant à 3,2 mm du bord solidarisé à la tige 7.

De façon préférée, et tel que schématisé, plusieurs zones de capture 10a, 10b, 10c, 10d sont présentes sur la face 14 du support 12, séparées par des zones d'intervalle 18. Dans le cadre représenté, quatre zones de capture sont présentes, mais il est clair que leur nombre dépend de l'utilisation, en particulier de la taille du dispositif 6, de la taille de la zone cible 3 et de la concentration de molécules d'intérêt dans cette zone 3, ainsi que de la surface développée des zones de capture 10 et du procédé de fabrication. De même, les zones d'intervalle 18 peuvent n'être que « virtuelles », c'est-à-dire que les zones de capture 10 sont confondues *a priori* au niveau macroscopique, mais que des moyens permettent de les distinguer au niveau microscopique, voire de les séparer.

Il est possible aussi que des zones de capture 20 soient placées sur la deuxième face 16. De façon préférée, et tel qu'il apparaîtra plus clairement plus loin, les deuxièmes zones de capture 20 sont

alignées et en opposition avec les premières zones 10. Les deuxièmes zones de capture 20 peuvent être de nature et géométrie identiques aux premières zones 10, ou différentes, tel que schématisé dans la figure 1 :  
5 les divers modes de réalisation présentés plus loin peuvent être combinés.

La surface développée de chacune des zones de capture 10, 20 est supérieure à trois fois la surface plane de la zone de capture 10, 20. Un mode de  
10 réalisation est présenté sur la figure 2.

La zone de capture 10 comprend une paroi de fond 22. Suivant le mode de fabrication, la paroi de fond 22 peut être localisée sur le support 12, ou peut y délimiter une cavité (voir figure 4). La paroi de  
15 fond 22 a une surface  $\underline{s}$ , et présente une pluralité de protubérances 24. De préférence, si la zone de capture comprend une cavité, la hauteur des protubérances 24 est identique à la profondeur de la cavité, mais il est possible qu'elles soient saillantes. Par ailleurs, il  
20 est préférable que la surface du support 12 soit uniforme, de préférence plane, à l'exception des zones de capture 10, et des éventuels moyens de séparation (décrits plus loin). En effet, une telle surface plane peut plus aisément être analysée par exemple lors d'une  
25 désorption laser en analyse de masse au vu de l'uniformité de l'énergie d'impact.

La surface développée  $\underline{S}$  de la zone de capture 10 est donc égale à la surface  $\underline{s}$  de la paroi de fond 22 à laquelle s'ajoute la surface de chacune des  
30 parois latérales des protubérances 24. Selon l'invention, les surfaces vérifient la relation :

$S \geq 3.s$ , le facteur 3 pouvant avantageusement prendre les valeurs 5 ou 10 par exemple.

Les protubérances 24 peuvent prendre toute géométrie désirée, par exemple des colonnes carrées ou à section hexagonale. De préférence, les protubérances 5 24 sont arrangées de façon régulière, par exemple en réseau à mailles carrées ou hexagonales. Selon le mode de réalisation préféré P, la structuration de surface se présente sous la forme de picots octogonaux 24 de 10 silicium, de 50  $\mu\text{m}$  de hauteur et 20 ou 80  $\mu\text{m}$  de largeur.

Différents procédés de fabrication sont envisageables pour de telles zones de capture 10 : par exemple, si le support 12 est en plastique, il est possible d'utiliser des techniques d'injection ou 15 d'empreinte à chaud (« *hot embossing* »), qui permettent d'obtenir par réplification des pièces complémentaires de moules réalisés préalablement. On pourra ainsi fabriquer des protubérances 24 de 20  $\mu\text{m}$  de côté, sur 20 une hauteur de 50  $\mu\text{m}$  à bas coût, sur un support 12 en polyéthylène, ou poly(méthyl)métacrylate (PMMA), ou polycarbonate, ou polydiméthylsiloxane (PDMS), ou parylène, ou Téflon™ ; une option est également de déposer un de ces matériaux, notamment le parylène ou 25 le Téflon™, sur une surface plastique, voire métallique, quelconque afin de la rendre biocompatible.

Si un rapport surface/volume plus élevé est souhaité, il est possible d'utiliser des techniques de microtechnologie. Par exemple, le procédé décrit en 30 référence aux figures 7 du document FR-A-2 846 957 peut être utilisé ; le procédé décrit dans ce document est

cependant simplifié car seul le support 12 est usiné :  
il n'y a pas de formation de canaux d'alimentation  
et/ou de scellement de capot. Un tel procédé permet  
d'obtenir des protubérances 24 de 5  $\mu\text{m}$  de côté sur une  
5 hauteur de 100  $\mu\text{m}$  sur un support 12 en silicium. Plus  
généralement, les protubérances 24 peuvent faire de 5 à  
20  $\mu\text{m}$  (même si des tailles jusque 80 ou 100  $\mu\text{m}$  peuvent  
aussi être réalisées de cette manière) de côté pour 50  
à 400  $\mu\text{m}$  de profondeur ; l'usinage du support 12 est  
10 tel qu'en fin de procédé, le dispositif soit  
biocompatible. En particulier, un support 12 en  
silicium est oxydé pour être revêtu de  $\text{SiO}_2$ , de  
comportement biocompatible analogue au verre.

Pour réaliser des zones de capture 10, 20  
15 sur les deux faces opposées du support 12, il est  
possible par exemple de coller deux supports 12, 12'  
réalisés comme précédemment (voir figure 7E), ou de  
fabriquer un module double face par les techniques  
microtechnologiques sur silicium ou de moulage  
20 plastique (figure 7D).

Afin d'augmenter encore la surface  
développée de la zone de capture 10, il est possible de  
remplir les espaces 26 entre les protubérances 24 par  
des microbilles 28. Les microbilles 28 sont utilisées  
25 de façon courante en microbiologie ; elles ont  
classiquement un diamètre de l'ordre d'une dizaine de  
nanomètres jusqu'à une centaine de microns, et peuvent  
être composées de verre, poreux ou non, ce qui leur  
permet d'être fonctionnalisées et de rester  
30 biocompatibles.

Suivant le mode de réalisation de la zone de capture 10 et le positionnement des protubérances 24, tel qu'expliqué dans le document FR-A-2 846 957, il est possible d'aboutir à un alignement des billes 28 dans les espaces 26 entre les protubérances 24 (figure 3B), ce qui facilite la quantification de la surface développée. Par exemple, les espaces 26 entre les protubérances ont une largeur inférieure à 50 µm. Cependant, tout autre mode de réalisation est possible, avec notamment un entassement au hasard. Il est possible également de dimensionner les espaces 26 de sorte que des premières billes 28 soient localisées précisément et que des deuxièmes billes 28' de diamètre inférieur puissent ensuite être mises en place (figure 3A).

En particulier, les microbilles 28 augmentent la surface développée de la zone de capture 10 de façon notable. Il peut être avantageux dans ce cas de ne pas avoir de protubérances 24, mais des zones de capture 30 composées de cuvettes 32 emplies de billes 28, tel que schématisé sur la figure 4. Les cuvettes 32 des zones de capture 30 peuvent être réalisées par exemple par gravure microtechnologique du support 12, ou par report d'un maillage de parois 34, ou par moulage de matériau plastique. Elles sont ensuite remplies par des microbilles 28, avantageusement calibrées.

En présence de microbilles comme sur les figures 3 et 4, il est avantageux de maintenir les billes 28 en place par une membrane poreuse 36. Le film poreux 36 est choisi de façon à laisser les molécules

d'intérêt migrer à l'intérieur de la zone de capture 10, 30. On peut utiliser des filtres commerciaux en polycarbonate de porosité inférieure au  $\mu\text{m}$  que l'on colle sur les cavités par sérigraphie (par exemple  
5 Dynamask™, de la société Dynatech), ou des films secs de résine photosensible (comme Ordyl™ de la société Elga) que l'on insole par photolithographie pour réaliser la porosité ; cette technique est plus adaptée pour des billes 28 de diamètre supérieur à 1  $\mu\text{m}$ .

10 Il peut être intéressant de fonctionnaliser tout ou partie des éléments des zones de capture 10, 30 en contact avec le milieu 3 à analyser pour assurer une optimisation de la fonction de capture et/ou pour cibler certaines molécules d'intérêt. En particulier,  
15 il est possible de fixer un marqueur sur les protubérances 24 et/ou les billes 28 et/ou les parois 22, 34.

Comme fonctionnalisation, on peut envisager la fixation de sondes ADN, la fixation d'anticorps  
20 spécifiques, la fixation d'une matrice d'affinité pour des analyses ultérieures en spectromètre de masse. Par exemple, il est possible de réaliser une chimie de couplage sur le dispositif de la figure 2 qui présente un oxyde épais  $\text{SiO}_2$  en surface.

25 Il est à noter qu'il est possible d'avoir dans une même zone de capture 10, 30 plusieurs fonctions différentes en jouant soit sur le fait que billes et parois sont fonctionnalisées différemment, soit sur un mélange de billes 28, 28', en particulier  
30 si leur diamètre est différent, tel que décrit dans FR-A-2 846 957.

En particulier, en ce qui concerne les parois 22, 24, 34 du dispositif, classiquement, la fonctionnalisation s'effectue en deux ou trois étapes (figure 5).

- 5 1) Synthèse d'une molécule organique bifonctionnelle Y-E-A appelée agent de couplage qui va permettre l'adhésion interfaciale non covalente entre les protéines et le support organique.
- 2) Fixation de l'agent de couplage sur le support  
10 inorganique 12, qui peut avoir été préalablement traité pour présenter une fonction de couplage W (en particulier, il s'agit de la fonction W silylée O-Si pour les substrats 12 en silicium recouvert d'une couche d'oxyde de silice), par réaction d'une  
15 des deux fonctions Y avec la surface, l'autre fonction A réagissant avec la protéine en formant une liaison non covalente.
- 3) Si la fonction terminale A permettant l'adsorption de la protéine n'a pu être synthétisée avec la  
20 fonction silylée pour cause d'incompatibilité chimique, le support modifié va subir une ou plusieurs réactions post-silanisation jusqu'à l'obtention de cette dernière.

La fonction de couplage A correspond à  
25 l'ensemble des fonctions organiques et minérales existantes telles que les fonctions : CH<sub>3</sub>, alcènes, alcynes, dérivés aryles, halogènes (Br, Cl, I, F), dérivés organométalliques, alcools, phénols, diols, éthers, époxy, dérivés carbonylés (aldéhydes, cétones,  
30 acides carboxyliques, carboxylates, esters, amides, chlorures d'acide, anhydrides d'acides), dérivés azotés

(amines, dérivés nitrés, dérivés diazos, imines, énamines, oximes, nitriles), dérivés phosphorés (phosphines, phosphites, phosphates, phosphonates), dérivés du silicium, dérivés du soufre (sulfures, dissulfures, thiols, thioéthers, sulfones, sulfites, sulfates, acides sulfoniques, sulfonates, azasulfoniums), dérivés du sélénium,...

Un groupe espaceur E, utilisé entre les deux fonctions A,Y de l'agent de couplage, permet de conférer des propriétés particulières au film obtenu par la silanisation. Le groupe E est choisi parmi les radicaux permettant d'obtenir une monocouche organisée : un radical E de type alkylène à longue chaîne permet une interaction interchaînes (parmi les radicaux E du type alkylène, on préfère tout particulièrement ceux qui ont de 8 à 24 atomes de carbone) ; un radical E comprenant deux triples liaisons  $-C\equiv C-$  permet une réticulation ; un radical E comprenant une chaîne aromatique conjuguée confère des propriétés d'optique non linéaire (à titre d'exemple, on peut citer les radicaux phénylène-vinylène et phénylène-acétylène) ; un radical E du type pyrrole, thiophène ou polysilane confère une conduction électronique ; un radical E du type polyaromatique hétérosubstitué confère des propriétés de photo/électroluminescence (à titre d'exemple, on peut citer les quinones et les composés diazoïques) ; un groupe E du type alkyle ou fluoroalkyle, en particulier un groupe alkyle ou fluoroalkyle ayant de 3 à 24 atomes de carbone, permet d'utiliser les couches obtenues en chromatographie ou en électrophorèse.

En ce qui concerne la fonctionnalisation des billes, le même principe est utilisé.

Par ailleurs, il est possible de déposer différents types de billes selon les zones 10i de  
5 prélèvement, et ainsi d'obtenir un outil présentant un étagement de fonctions d'affinité A.

Par exemple, pour un substrat 12 de surface hydrophile comme  $\text{SiO}_2$ , silanisé, les fonctions esters de surface situées sur l'outil vont réagir avec des  
10 billes fonctionnalisées porteuses de fonction hydroxyle primaire. Après l'immobilisation des billes 28, l'outil possède une surface développée hydrophile (figure 6A).

Il est possible également d'utiliser la fonctionnalisation de billes 28 pour obtenir un autre  
15 effet : l'augmentation de la sensibilité de l'analyse en masse par saturation des espèces majoritaires grâce à l'utilisation de pools de billes porteuses de ligands (lissage dynamique). Par exemple, si une surface recouverte de deux billes porteuses chacune d'un  
20 ligand, spécifique d'une protéine majoritaire pour la première et minoritaire pour la seconde, est mise au contact du tissu, la surface piègera autant de protéines majoritaires que minoritaires, ce qui conduit à une détection plus facile de cette deuxième catégorie  
25 lors de la phase ultérieure d'analyse par le spectromètre de masse. La dynamique protéines majoritaires/minoritaires étant de 12 log dans la nature, on comprend l'intérêt de cette approche développée par ciphergen® sur ses barrettes lors de la  
30 phase de rinçage de l'échantillon avant dépôt sur la barrette. Grâce au dispositif selon l'invention, il est

possible d'appliquer ce principe pour un prélèvement par apposition sans transfert postérieur.

L'une des options est de préparer dans n éprouvettes n types de billes 28 porteurs chacun d'un ligand spécifique, de les mélanger, puis de les fixer à l'outil via le ligand Y ( $\text{NH}_2$  pour la figure 6B). Une autre option est de mélanger n types de ligands spécifiques et de les fixer sur un outil préalablement fonctionnalisé par des billes (figure 6C).

Par ailleurs, dans le cas où le dispositif de prélèvement 6 possède plusieurs zones de capture (voir figure 1), il est possible d'utiliser les mêmes fonctions sur chaque zone de capture, ou d'opérer une différenciation spatiale, comme par exemple par le dépôt localisé par gouttes (« *spotting* ») connu pour les puces à ADN.

Selon l'utilisation et notamment les analyses des molécules prélevées, il peut être intéressant de séparer les zones de capture d'un même dispositif 6. En particulier, les supports peuvent être sécables pour chacun des modes de réalisation précédents.

Afin de faciliter la section du support, avantageusement, les zones d'intervalle entre les zones de capture sont munies de moyens de séparation. Par exemple, des encoches peuvent avoir été gravées en même temps que la réalisation des protubérances et/ou des parois : figures 7. Les zones d'intervalle peuvent alors facilement être sectionnées.

Différents modes de réalisation sont envisageables : par exemple, il est possible de réaliser une amorce de clivage 42 par gravure du support 12 sur la face 16 opposée à la face 14  
5 comprenant les zones de capture 10, par masque et gravure par exemple (figure 7A). On peut également réaliser cette encoche 44 sur la face « avant » 14, ou choisir par exemple une gravure chimique isotrope, par exemple au KOH (figure 7B).

10 En ce qui concerne les dispositifs du type de la figure 4, c'est-à-dire à cuvette simple 32, habituellement, les zones d'intervalle sont composées de parois 34. Il peut être souhaitable dans ce cas de définir également des encoches de clivage 46 en face  
15 arrière en dessous des parois 34 : figure 7C.

Si des zones de capture 10, 20 sont présentes sur chaque face 14, 16, il est possible de ne positionner des moyens de séparation que sur l'une des faces (figure 7D), ou sur les deux (figure 7E). On peut  
20 noter à cet égard deux modes de réalisation pour les dispositifs comprenant des zones de capture 10, 20 sur chacune de leurs faces opposées 14, 16 : un support 12 (figure 7D) ou collage de deux supports 12, 12' (figure 7E).

25 Il est clair également que les différents modes de réalisation d'encoches 42, 44, 46 peuvent être utilisés indifféremment et en combinaison.

Selon le mode de réalisation préféré P, une plaquette de silicium de 100 mm de diamètre est usinée  
30 pour obtenir 142 dispositifs finaux après découpe. Le support 12 en silicium est avantageusement marqué : en

particulier, le nom du dispositif, des croix d'alignement, des repères de découpe,... sont gravés, par exemple à 500 nm, par photolithographie avec masque et gravure sèche.

5                   La face arrière subit un traitement similaire (photolithographie avec masque aligné sur le précédent, gravure sèche de 5 à 10  $\mu\text{m}$ , retrait de la résine du masque) pour former les encoches 46. La face avant est alors dessinée et gravée pour la  
10 microstructuration, avec photolithographie avec masque aligné, gravure sèche profonde à 50  $\mu\text{m}$  et retrait de la résine. Les surfaces sont ensuite préparées afin de permettre leur utilisation biologique et/ou médicale : en particulier le polymère (par exemple  $\text{C}_4\text{F}_8$ ) formé sur  
15 les flancs des cavités lors des gravures est éliminé, par désoxydation totale, suivi d'une oxydation humide sur 100 nm, puis d'une désoxydation totale ; une couche de  $\text{SiO}_2$  finale est obtenue par oxydation humide sur 500 nm.

20                   Selon un mode d'utilisation du dispositif selon l'invention schématisé en figure 8, le guide 2 est d'abord mis en place, de préférence sous contrôle dans la zone cible 3 ; le support 12 est collé en bout de tige 7. La tige 7 est insérée dans le guide 2, sous  
25 contrôle optique également afin d'assurer la précision de son positionnement, et en particulier de déterminer les zones A, B, C, D de la tumeur 3 correspondant à chacune des zones de capture 10a-10d. Une fois les zones de capture 10a-10d en place, les moyens  
30 d'obturation 5 sont ouverts, et le prélèvement est effectué par apposition ; aucune manipulation du

dispositif lui-même n'est nécessaire, la surface de contact des zones de capture 10 étant directement accessible (sans capot par exemple). Ceci permet par ailleurs une miniaturisation de l'ensemble, et  
5 notamment du support 12. Les moyens d'obturation 5 peuvent ensuite éventuellement être refermés. La tige 7 est alors retirée du guide 2, le support 12 en est détaché, et les zones de capture 10a-10d peuvent être analysées.

10 Deux approches pour le traitement de l'échantillon prélevé peuvent être mises en œuvre lors de l'analyse :

1) Le dispositif 6 est sécable, et chaque zone 10a-10d est traitée de façon indépendante. De fait, une  
15 fois la tige 7 retirée, le support 12 est cassé et les différentes zones 10a-10d sont introduites dans des tubes de lavage et d'extraction 50a-50d. Les molécules A, B, C, D ainsi extraites peuvent être stockées dans une banque de données et/ou déposées  
20 sur une barrette pour une analyse, par exemple une barrette CIPHERGEN® utilisée notamment pour réaliser une analyse par spectrométrie de masse pour une analyse protéomique, comme SELDI-TOFF®.

2) Il est possible également de ne pas couper le  
25 support 12, qui conserve ainsi la définition des zones actives A-D étagées au sein de la tumeur 3. C'est le support 12 lui-même qui sert de substrat pour le dispositif 60 d'analyse finale, par exemple par une désorption directe assistée sous laser.

30 Quelle que soit l'approche choisie, on peut obtenir une cartographie du tissu d'intérêt, et des

résultats concernant la composition protéique en fonction de la profondeur dans la zone cible 3.

Le dispositif de prélèvement selon l'invention présente ainsi des caractéristiques  
5 particulièrement avantageuses :

- le prélèvement est peu invasif : en particulier, le diamètre apparent du dispositif 6, et même du système 1, est réduit, notamment à quelques millimètres, de préférence 1 mm tout en conservant une  
10 forte surface développée pour capturer suffisamment de molécules cibles ;

- le prélèvement est peu agressif : il se fait par contact (ou « apposition ») sans section de tissu 3 ;

15 - la partie du dispositif usinée et servant réellement au prélèvement est réduite et ne couvre que le support 12, qui peut être associé à une tige de manipulation 7 de bas coût ;

- l'usinage de la partie servant au  
20 prélèvement 12 est réduit à la fabrication des zones de contact 10, 20, 30, sans autres éléments mécaniques ni étapes supplémentaires de scellement ou collage ;

- la forte surface développée des zones de capture 10, 20, 30 compense la miniaturisation et  
25 permet des analyses fiables ;

- le dispositif 6 peut être utilisé en geste opératoire *in vivo* ou en post-opératoire, voire *in vitro* sur un tissu prélevé et demandeur d'analyse moléculaire ;

30 - la présence de zones de capture 10a-10d étagées permet d'analyser après empreinte la

répartition des molécules d'intérêt dans la zone de prélèvement 3 ;

- chaque zone de capture 10, 30 peut être fonctionnalisée selon les molécules ciblées et/ou le type d'analyse finale (génomique, protéomique) ;

- chaque zone de capture 10a-10d peut être séparée des autres et être analysée par une technique propre ;

- le support du dispositif 12 peut être compatible avec tout équipement d'analyse ultérieure, par exemple il peut comprendre une matrice spécifique pour la spectrographie de masse ;

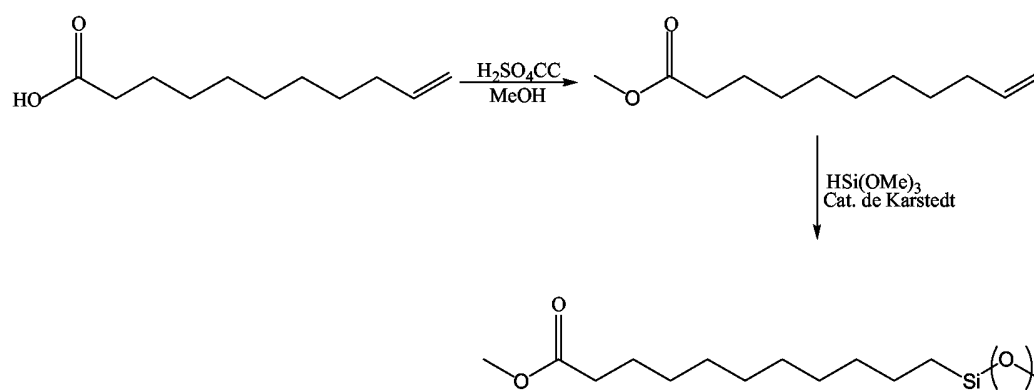
- une cartographie selon l'axe de profondeur de la zone 3 analysée peut être établie selon les zones actives A-D successives différenciées le long du dispositif ; la méthode opératoire sous stéréoscopie permet en effet de guider précisément le dispositif 6 et de savoir exactement quelle région A-D a été sondée.

## 20 **EXEMPLE DE REALISATION**

Le dispositif précédent P (support 12 en Si de  $600 \times 300 \mu\text{m}^2$ , avec protubérances 24 octogonales) a été silanisé puis fonctionnalisé pour donner la fonction carboxylate. En effet, à pH physiologique, les systèmes biologiques et notamment les protéines sont naturellement chargés ; les interactions ioniques (basés sur les principes de la chromatographie) peuvent être utilisées pour absorber de façon spécifique des marqueurs protéiques. Pour les surfaces anioniques

(chargées négativement), les dérivés carboxylates sont les plus couramment utilisés.

Les fonctions carboxylate et silane étant incompatibles, une stratégie de synthèse indirecte via l'ester de méthyle de l'acide triméthoxysilylundécane-10-oïque a été choisie.



La fonction acide est protégée sous la forme d'un ester de méthyle après réaction de l'acide undécénoïque avec de l'acide sulfurique et du méthanol ; l'incorporation du groupement silylé s'effectue classiquement par une réaction d'hydrosilylation.

Par exemple, un ester de méthyle de l'acide 10-undéc-1-énoïque est fabriqué pour former l'ester de méthyle de l'acide triméthoxysilylundécane-10-oïque par le procédé suivant :

- A une solution d'acide undécénoïque (98 %) (10,47 g ; 11,5 mL ; 56 mmol) dissout dans 500 mL de méthanol, est additionné de l'acide sulfurique concentré (12,88 g ; 7 mL ; 131 mmol ; 2,3 éq.). La réaction se déroule à 0°C durant 4 heures.

- Après évaporation du méthanol et reprise à l'acétate d'éthyle, le mélange réactionnel est lavé successivement avec de l'EDI ( $\times 2$ ) et avec une solution saturée de chlorure de sodium, séché sur du sulfate de magnésium anhydre puis concentré pour donner un liquide incolore (10,99 g ; 99 %). On obtient les caractéristiques suivantes :
- $\delta_{\text{H}}$  (200 MHz ;  $\text{CDCl}_3$ ) : 1,30 (10H ; m ;  $\text{H}^{5-9}$ )  
1,62 (2H ; m ;  $\text{H}^4$ )  
2,04 (2H ; m ;  $\text{H}^{10}$ )  
2,31 (2H ; t ;  $\text{H}^3$  ;  $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 7,4$  Hz)  
3,67 (3H ; s ;  $\text{H}^1$ )  
4,97 (2H ; m ;  $\text{H}^{12}$ )  
5,81 (1H ; m ;  $\text{H}^{11}$ )
- $\delta_{\text{C}}$  (200 MHz ;  $\text{CDCl}_3$ ) : 25,31  
29,26  
29,42  
29,50  
29,58  
29,66  
34,16  
34,44  
51,76 ( $\text{C}^1$ )  
114,51 ( $\text{C}^{12}$ )  
139,46 ( $\text{C}^{11}$ )  
174,61 ( $\text{C}^2$ )
- L'ester méthylique de l'acide 10-undéc-1-énoïque (10,58 g ; 53 mmol) est mélangé avec du triméthoxysilane (95 %) (8,75 g ; 9,1 mL ; 68 mmol ; 1,3 éq.). Le catalyseur de Karstedt (0,13 g ; 0,13 mmol ; 0,0025 éq.) est additionné

très lentement. La réaction se déroule à température ambiante durant 16 heures. Le brut réactionnel est purifié par distillation pour donner un liquide incolore (120-125°C à 0,5 mbar ;  
 5 11,7 g ; 70 %) :

	$\delta_{\text{H}}$ (200 MHz ; $\text{CDCl}_3$ ) :	0,65 (2H ; m ; $\text{H}^{12}$ )
		1,27 (14H ; m ; $\text{H}^{5-11}$ )
		1,62 (2H ; m ; $\text{H}^4$ )
		2,30 (2H ; t ; $\text{H}^3$ ; $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 7,4$ Hz)
10		3,57 (9H ; s ; $\text{H}^{13}$ )
		3,67 (3H ; s ; $\text{H}^1$ )
	$\delta_{\text{C}}$ (200 MHz ; $\text{CDCl}_3$ ) :	9,21 ( $\text{C}^{12}$ )
		22,68
		25,04
15		29,23
		29,38 (2C)
		29,50 (2C)
		33,17
		34,19
20		50,55 ( $\text{C}^{13}$ )
		51,46 ( $\text{C}^1$ )
		174,38 ( $\text{C}^2$ )
	$\delta_{\text{Si}}$ (200 MHz ; $\text{CDCl}_3$ ) :	-41,30 (s)

L'hydroxylation du substrat en silicium  
 25 recouvert d'une couche d'oxyde thermique de 500 nm est  
 réalisée dans une solution de soude 3,5 M pendant 2  
 heures, avec une solution silanisante de concentration  
 $10^{-2}$  M dans du trichloroéthylène anhydre, les réactions  
 de silanisation étant effectuées à une température  
 30 contrôlée de 2°C pendant 24 h.

Le support modifié est mis au contact d'une solution d'iodure d'aluminium afin de libérer la fonction acide carboxylique, qui va à son tour réagir avec une solution aqueuse de soude pour donner la  
5 fonction carboxylate correspondante.

Ce dispositif a été utilisé pour une analyse de masse sur une tumeur cérébrale (gliome), obtenue après exérèse.

Le tissu est apposé sur l'outil puis après  
10 rinçage et dépôt de la matrice, l'analyse est réalisée directement sur la surface.

Les spectres de masse obtenus sur un SELDI-TOFF vendu sous la dénomination ProteinChip® System Series 4000 par la société Ciphergen est présenté sur  
15 la figure 9, les zones grisées représentant les protéines majoritaires hémoglobine et transferrine.

On note que la chimie de surface a un rôle capital puisque l'analyse de la surface sans chimie B montre un nombre de marqueurs beaucoup moins important  
20 que sur la surface chimiquement modifiée A (anionique par  $\text{COO}^-$ ).

**REVENDICATIONS**

1. Dispositif microtechnologique (6) de  
prélèvement de molécules d'intérêt biologique par  
5 contact comprenant un support (12) ayant une première  
face (14) opposée à une deuxième face (16) et au moins  
une première zone de capture (10) sur la première face  
(14) telle que la surface développée (S) de la première  
zone de capture (10) est au moins trois fois supérieure  
10 à sa surface (s).

2. Dispositif selon la revendication 1  
comprenant au moins une deuxième zone de capture (20)  
sur la deuxième face (16) telle que la surface  
15 développée de la deuxième zone de capture (20) est  
supérieure à sa surface.

3. Dispositif selon la revendication 2 dans  
lequel la surface développée de la deuxième zone de  
20 capture (20) est au moins trois fois supérieure à sa  
surface.

4. Dispositif selon l'une des  
revendications 1 à 3 comprenant une pluralité de  
25 premières zones de capture (10a-10d) sur la première  
face (14) séparées par des premières zones d'intervalle  
(18).

5. Dispositif selon la revendication 4  
30 comprenant une pluralité de deuxièmes zones de capture  
sur la deuxième face (16) séparées par des deuxièmes

zones d'intervalle, chaque première zone étant opposée à une deuxième zone.

6. Dispositif selon l'une des  
5 revendications 4 ou 5 comprenant des moyens (42, 44, 46) pour séparer les zones de capture (10a-10d, 30) dans les zones d'intervalle (18, 34).

7. Dispositif selon la revendication 6 dans  
10 lequel les moyens pour séparer comprennent des encoches sur la première et/ou la deuxième face (14, 16).

8. Dispositif selon l'une des  
revendications 1 à 7 dans lequel le support (12) est  
15 sous forme de plaque.

9. Dispositif selon la revendication 8 dans  
lequel les première et deuxième faces (14, 16) du  
support (12) sont planes à l'exception des zones de  
20 capture (10, 20) et des éventuels moyens pour séparer (42, 44, 46).

10. Dispositif selon l'une des  
revendications 1 à 9 dans lequel une zone de capture  
25 (10) comprend une paroi de fond (22) munie d'une pluralité de protubérances (24).

11. Dispositif selon la revendication 10  
dans lequel le support (12) est en plastique.

12. Dispositif selon la revendication 10 dans lequel le support (12) est un substrat microtechnologique, notamment en silicium.

5                   13. Dispositif selon l'une des revendications 10 à 12 dans lequel la hauteur des protubérances (24) est comprise entre 10  $\mu\text{m}$  et 400  $\mu\text{m}$  et la surface des protubérances (24) est comprise entre 3 x 3  $\mu\text{m}$  et 80 x 80  $\mu\text{m}$ .

10

14. Dispositif selon l'une des revendications 10 à 13 dans lequel les protubérances (24) sont séparées par des espaces (26) dont la largeur est inférieure à 50  $\mu\text{m}$ .

15

15. Dispositif selon l'une des revendications 10 à 14 dans lequel les protubérances (24) sont à section hexagonale ou octogonale.

20

16. Dispositif selon l'une des revendications 10 à 15 dans lequel la paroi de fond (22) et/ou les protubérances (24) sont fonctionnalisées.

25

17. Dispositif selon l'une des revendications 10 à 16 comprenant des microbilles (28) dans les espaces (26) entre les protubérances (24).

18. Dispositif selon l'une des  
30 revendications 1 à 17 dans lequel une zone de capture

(30) au moins comprend une cuvette (32) et des microbilles (28) disposées dans la cuvette (32).

19. Dispositif selon l'une des  
5 revendications 17 à 18 comprenant une membrane (36) pour maintenir les microbilles (28) dans la zone de capture (10, 30).

20. Dispositif selon l'une des  
10 revendications 17 à 19 dans lequel les microbilles (28) sont fonctionnalisées.

21. Dispositif selon la revendications 20 dans lequel la fonctionnalisation des microbilles (18)  
15 comprend au moins deux ligands différents, spécifiques d'une protéine majoritaire et d'une protéine minoritaire.

22. Dispositif selon l'une des  
20 revendications 16, 20 ou 21 dans lequel la fonctionnalisation comprend la présence de ligands solidarisés à la surface par une fonction silylée.

23. Dispositif selon l'une des  
25 revendications 1 à 22 comprenant en outre une tige de manipulation (7), le support (12) pouvant être associé à une extrémité de la tige.

24. Système de prélèvement (1) comprenant  
30 un dispositif (6) selon la revendication 23 et un manchon de guidage (2).

25. Procédé de cartographie d'un tissu (3) comprenant :

- la mise en place au sein du tissu d'un dispositif microtechnologique (6) comprenant une pluralité de zones de capture (10a-10d) étagées, une zone de capture (10) ayant une surface développée supérieure à trois fois sa surface,
- le contact entre le tissu (3) et les zones de capture (10),
- l'analyse du prélèvement.

26. Procédé selon la revendication 25 comprenant la section du dispositif (6) de façon à séparer les zones de capture (10a-10d).

27. Procédé selon l'une des revendications 25 à 26 dans lequel le dispositif microtechnologique est défini selon l'une des revendications 1 à 24.



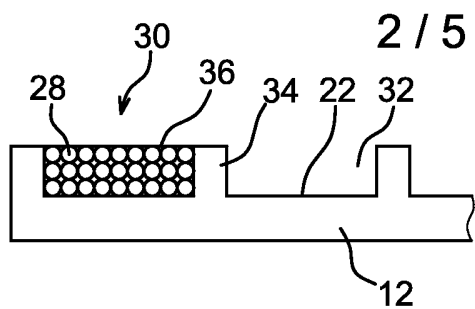


FIG. 4

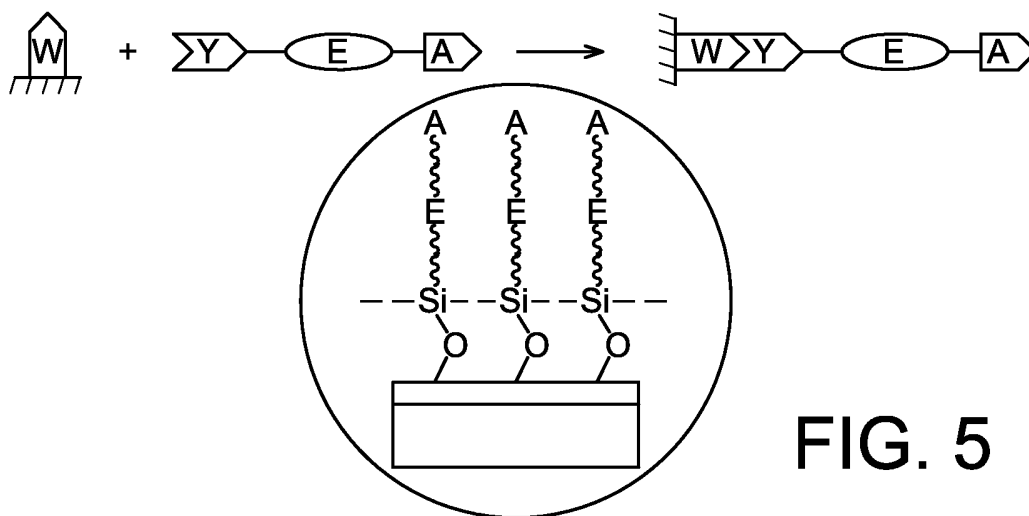
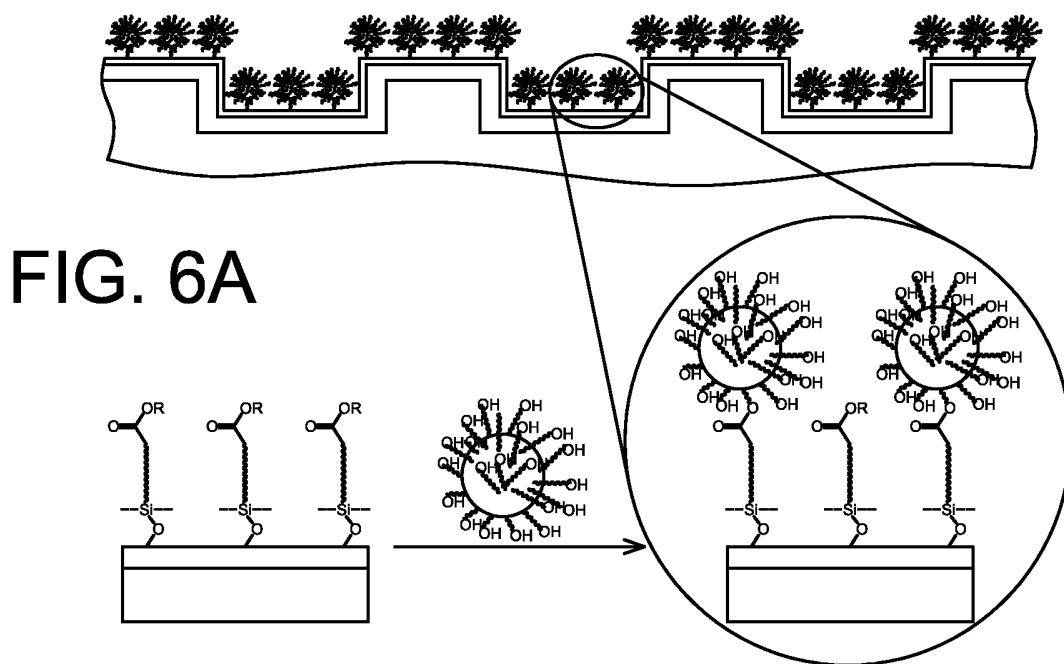


FIG. 5



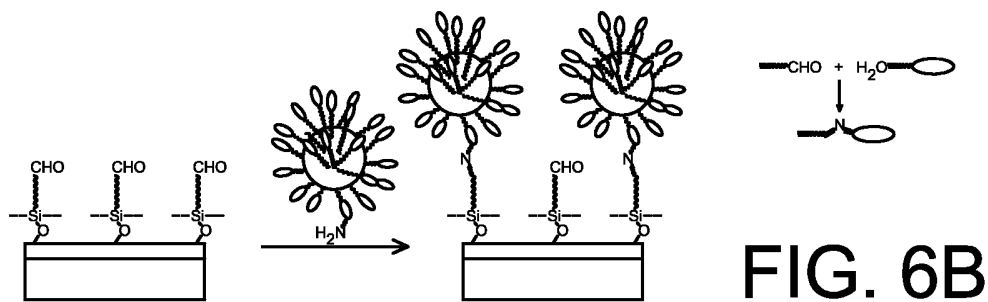


FIG. 6B

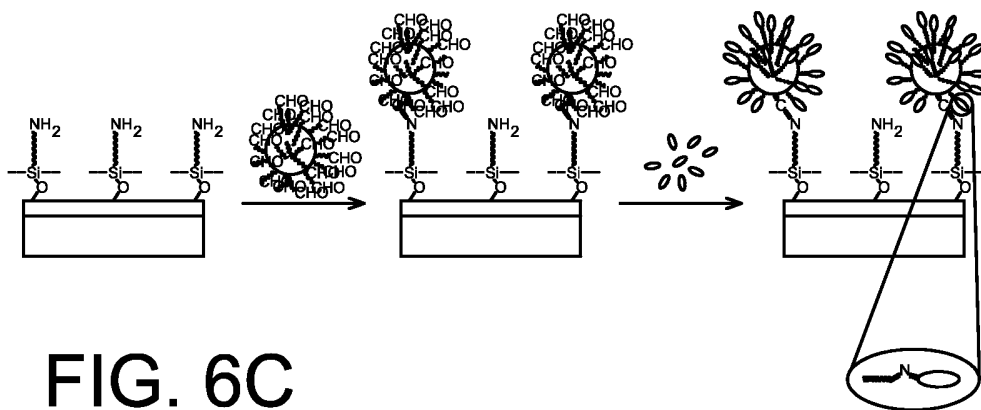


FIG. 6C

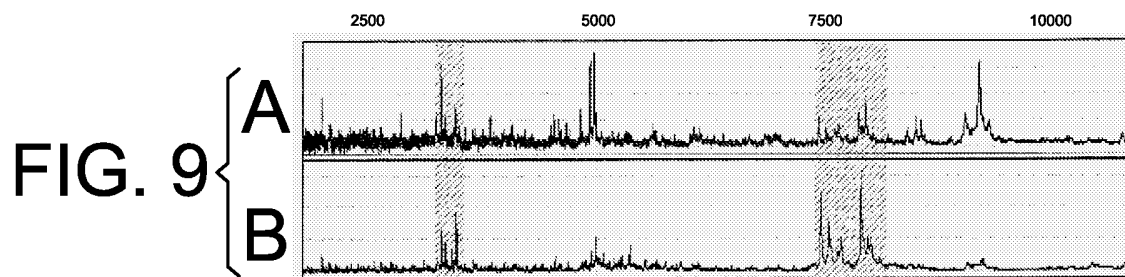


FIG. 9

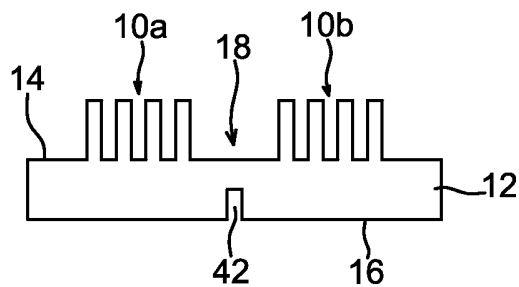


FIG. 7A

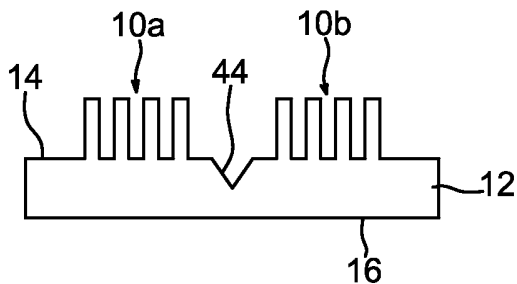


FIG. 7B

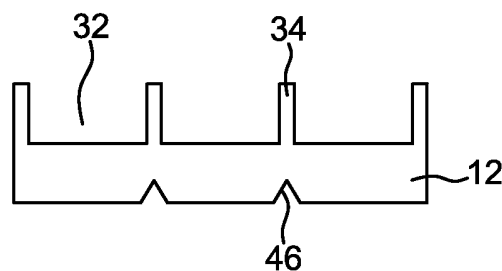


FIG. 7C

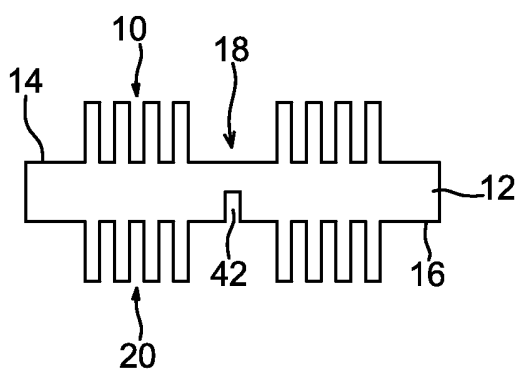


FIG. 7D

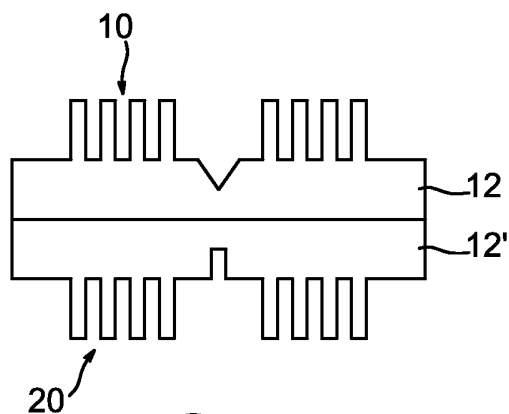


FIG. 7E

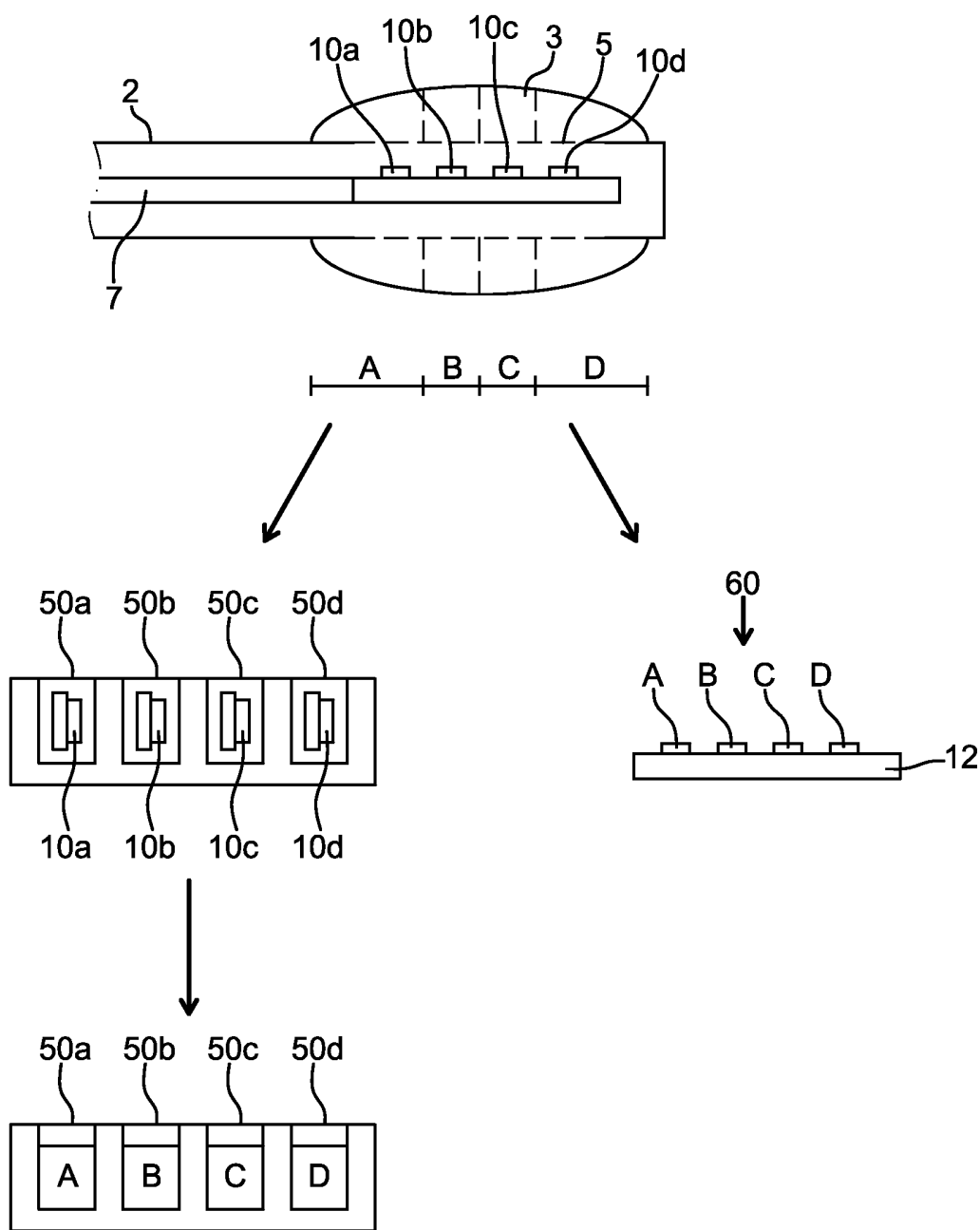


FIG. 8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No PCT/FR2006/050089
---

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
INV. A61B10/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A61B

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

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 133 361 A (COX L. & COX D.) 28 July 1992 (1992-07-28)  abstract; claims 1-3; figures column 1, line 50 - column 2, line 33	1-6, 8-15, 23-25,27
Y	US 4 243 049 A (GOODALE R.L.) 6 January 1981 (1981-01-06)  column 1, line 12 - line 28 column 1, line 43 - line 59 column 2, line 39 - line 43 column 2, line 50 - line 68 figure 4	1-6, 8-15, 23-25,27
	----- -/--	

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

\* Special categories of cited documents :

*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*E* earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  13 June 2006	Date of mailing of the international search report  21/06/2006
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Nice, P
---	-----------------------------------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2006/050089

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 981 143 A (SAKITA H. & IKESUE T.) 1 January 1991 (1991-01-01) column 3, line 48 - line 52 column 4, line 65 - column 5, line 3 figures -----	1,8,9,25
A	US 6 607 494 B1 (FOWLER ROBERT STUART) 19 August 2003 (2003-08-19)  column 4, line 40 - column 5, line 21; figures 1,2 -----	1-3, 8-11, 23-25
A	FR 2 846 957 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 14 May 2004 (2004-05-14) cited in the application page 13, line 13 - page 14, line 8 page 21, line 20 - page 23, line 30; figures 1-3 -----	12-22
A	WO 99/25251 A (HARWILL INDUSTRIES LTD; GEMMELL, PETER, ALAN; FOURIE, PIETER, ROUSSEA) 27 May 1999 (1999-05-27) page 5, line 26 - page 8, line 14; figures 1-6 -----	1-3
A	EP 1 234 543 A (OLYMPUS OPTICAL) 28 August 2002 (2002-08-28) paragraphs [0019], [0024]; claims 1,4,5,7; figures 1-4 -----	1,25
A	FR 2 760 626 A (LABORATOIRE CCD) 18 September 1998 (1998-09-18) figures 1,3 -----	1,25
A	US 4 700 713 A (KIST ET AL) 20 October 1987 (1987-10-20) column 2, line 61 - column 4, line 8; figures -----	1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/FR2006/050089

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see supplemental sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:**

**1. Claims: 1-15, 23-27**

**micro-sampling device with slots and process including the severing of said device**

**2. Claims: 16, 22**

**micro-sampling device with functionalised portions**

**3. Claims: 17-21**

**micro-sampling device with microspheres**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/FR2006/050089
---

Patent document cited in search report	A	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5133361	A	28-07-1992	NONE	
US 4243049	A	06-01-1981	NONE	
US 4981143	A	01-01-1991	JP 1465722 C JP 61280851 A JP 63009863 B	10-11-1988 11-12-1986 02-03-1988
US 6607494	B1	19-08-2003	NONE	
FR 2846957	A	14-05-2004	EP 1560785 A2 WO 2004046020 A2 US 2006068450 A1	10-08-2005 03-06-2004 30-03-2006
WO 9925251	A	27-05-1999	AU 1164999 A BR 9814190 A CA 2310254 A1 CN 1282229 A EP 1030601 A1 HU 0100218 A2 ID 21307 A JP 2001522683 T PL 340584 A1	07-06-1999 03-10-2000 27-05-1999 31-01-2001 30-08-2000 28-06-2001 20-05-1999 20-11-2001 12-02-2001
EP 1234543	A	28-08-2002	AU 7671401 A WO 0211619 A1 US 2002123697 A1	18-02-2002 14-02-2002 05-09-2002
FR 2760626	A	18-09-1998	EP 0864296 A1	16-09-1998
US 4700713	A	20-10-1987	AU 588461 B2 AU 7339087 A CA 1268092 A1 DE 3675360 D1 EP 0228752 A1 NL 8503596 A	14-09-1989 08-12-1988 24-04-1990 06-12-1990 15-07-1987 16-07-1987

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2006/050089

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
 INV. A61B10/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

 Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
 A61B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

 Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)  
 EPO-Internal

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 5 133 361 A (COX L. & COX D.) 28 juillet 1992 (1992-07-28)  abrégé; revendications 1-3; figures colonne 1, ligne 50 - colonne 2, ligne 33 -----	1-6, 8-15, 23-25, 27
Y	US 4 243 049 A (GOODALE R.L.) 6 janvier 1981 (1981-01-06)  colonne 1, ligne 12 - ligne 28 colonne 1, ligne 43 - ligne 59 colonne 2, ligne 39 - ligne 43 colonne 2, ligne 50 - ligne 68 figure 4  -----	1-6, 8-15, 23-25, 27
	-/--	

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

 Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

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

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

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

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

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

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

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

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

\*&amp;\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 juin 2006

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/06/2006

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

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

Fonctionnaire autorisé

Nice, P

6

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR2006/050089

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 4 981 143 A (SAKITA H. & IKESUE T.) 1 janvier 1991 (1991-01-01) colonne 3, ligne 48 - ligne 52 colonne 4, ligne 65 - colonne 5, ligne 3 figures -----	1,8,9,25
A	US 6 607 494 B1 (FOWLER ROBERT STUART) 19 août 2003 (2003-08-19)  colonne 4, ligne 40 - colonne 5, ligne 21; figures 1,2 -----	1-3, 8-11, 23-25
A	FR 2 846 957 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 14 mai 2004 (2004-05-14) cité dans la demande page 13, ligne 13 - page 14, ligne 8 page 21, ligne 20 - page 23, ligne 30; figures 1-3 -----	12-22
A	WO 99/25251 A (HARWILL INDUSTRIES LTD; GEMMELL, PETER, ALAN; FOURIE, PIETER, ROUSSEA) 27 mai 1999 (1999-05-27) page 5, ligne 26 - page 8, ligne 14; figures 1-6 -----	1-3
A	EP 1 234 543 A (OLYMPUS OPTICAL) 28 août 2002 (2002-08-28) alinéas [0019], [0024]; revendications 1,4,5,7; figures 1-4 -----	1,25
A	FR 2 760 626 A (LABORATOIRE CCD) 18 septembre 1998 (1998-09-18) figures 1,3 -----	1,25
A	US 4 700 713 A (KIST ET AL) 20 octobre 1987 (1987-10-20) colonne 2, ligne 61 - colonne 4, ligne 8; figures -----	1

**Cadre II Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1.  Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
  
2.  Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
  
3.  Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre III Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1.  Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2.  Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3.  Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4.  Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant
- Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

**SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-15, 23-27

Dispositif de prélèvement microtechnologique avec des encoches, et procédé comprenant la section dudit dispositif  
---

2. revendications: 16,22

Dispositif de prélèvement microtechnologique, avec des parties fonctionnalisées  
---

3. revendications: 17-21

Dispositif de prélèvement microtechnologique comprenant des microbilles  
---

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2006/050089

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5133361	A	28-07-1992	AUCUN	
US 4243049	A	06-01-1981	AUCUN	
US 4981143	A	01-01-1991	JP 1465722 C JP 61280851 A JP 63009863 B	10-11-1988 11-12-1986 02-03-1988
US 6607494	B1	19-08-2003	AUCUN	
FR 2846957	A	14-05-2004	EP 1560785 A2 WO 2004046020 A2 US 2006068450 A1	10-08-2005 03-06-2004 30-03-2006
WO 9925251	A	27-05-1999	AU 1164999 A BR 9814190 A CA 2310254 A1 CN 1282229 A EP 1030601 A1 HU 0100218 A2 ID 21307 A JP 2001522683 T PL 340584 A1	07-06-1999 03-10-2000 27-05-1999 31-01-2001 30-08-2000 28-06-2001 20-05-1999 20-11-2001 12-02-2001
EP 1234543	A	28-08-2002	AU 7671401 A WO 0211619 A1 US 2002123697 A1	18-02-2002 14-02-2002 05-09-2002
FR 2760626	A	18-09-1998	EP 0864296 A1	16-09-1998
US 4700713	A	20-10-1987	AU 588461 B2 AU 7339087 A CA 1268092 A1 DE 3675360 D1 EP 0228752 A1 NL 8503596 A	14-09-1989 08-12-1988 24-04-1990 06-12-1990 15-07-1987 16-07-1987