

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①① N° de publication : **3 058 524**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **16 60749**

⑤① Int Cl⁸ : **G 01 N 33/49** (2006.01), G 01 N 27/06, G 01 N 27/07

①②

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ PROCÉDE DE CARACTERISATION D'UN ECHANTILLON SANGUIN.

②② Date de dépôt : 07.11.16.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 11.05.18 Bulletin 18/19.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 25.01.19 Bulletin 19/04.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : UNIVERSITE PIERRE ET MARIE
CURIE (PARIS 6) Etablissement public —FR,
CONCEPTION DE SYSTEMES ET TECHNOLOGIE
MECANIQUE: CSTM Société à responsabilité limitée
— FR.

⑦② Inventeur(s) : RENDU FRANCINE, DUFILHO
MONIQUE et DUGUE FRANCOIS.

⑦③ Titulaire(s) : UNIVERSITE PIERRE ET MARIE
CURIE (PARIS 6) Etablissement public, INSTITUT
NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE, CONCEPTION DE SYSTEMES ET
TECHNOLOGIE MECANIQUE: CSTM Société à
responsabilité limitée, SORBONNE UNIVERSITE
Etablissement public.

⑦④ Mandataire(s) : IPAZ.

FR 3 058 524 - B1



«Procédé de caractérisation d'un échantillon sanguin»

Domaine technique

5 La présente invention concerne un procédé de caractérisation d'un échantillon sanguin.

Un tel dispositif permet par exemple à un utilisateur de mesurer et/ou caractériser l'agrégation de plaquettes d'un échantillon sanguin.

10 **Etat de la technique antérieure**

On connaît un procédé de caractérisation d'un échantillon sanguin utilisant un dispositif tel que décrit dans le document WO 2009/053841.

15 Ce document propose comme procédé de pré-remplir un capillaire avec de l'eau puis d'introduire dans le capillaire un échantillon sanguin. Le passage du front séparant les deux liquides produit une variation de capacitance entre deux électrodes de mesure, qui est mesurée et permet de détecter et/ou caractériser l'état d'activation des plaquettes de l'échantillon sanguin.

20 Un tel procédé pose cependant deux problèmes techniques correspondant à:

- une amélioration possible de la reproductibilité des mesures, et/ou
- une meilleure discrimination de différents échantillons sanguins,
- une amélioration de la reproduction des conditions physiopathologiques.

25 Le but de la présente invention est de résoudre au moins un de ces problèmes.

Exposé de l'invention

30 Cet objectif est atteint avec un procédé de caractérisation d'un échantillon sanguin, comprenant :

- une insertion dans un canal d'une solution comprenant des plaquettes sanguines, ledit canal comprenant une entrée et une sortie, la solution étant insérée par l'entrée du canal,

- une création d'une différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal, de manière à faire progresser la solution de l'entrée vers la sortie du canal,
- un passage de la solution dans une zone de mesure du canal munie d'électrodes,
- une mesure, par lesdites électrodes et des moyens de mesure, d'un signal électrique alors que lesdites électrodes sont recouvertes par la solution dans le canal,

5

caractérisé en ce que la progression de la solution de l'entrée vers la sortie du canal comprend une progression d'un front entre d'une part la solution s'étendant du front vers l'entrée du canal et d'autre part un gaz s'étendant du front vers la sortie du canal.

10

La solution a de préférence, lors du passage du front par l'entrée du canal, un taux de cisaillement aux parois internes du canal supérieur à $10\ 000\ \text{s}^{-1}$.

15

La solution a de préférence, pendant la progression du front de l'entrée vers la sortie du canal, un taux de cisaillement aux parois internes du canal qui diminue avec le temps au fur et à mesure de l'avancée du front entre la solution et le gaz, de préférence jusqu'à ce que le front atteigne la sortie du canal.

20

La solution a de préférence, lors du passage du front par la sortie du canal, un taux de cisaillement aux parois internes du canal inférieur à $1000\ \text{s}^{-1}$.

25

La différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal est de préférence constante pendant la progression de la solution dans le canal, de préférence au moins jusqu'à ce que le front atteigne la sortie du canal et/ou jusqu'à la mesure.

30

Le canal a de préférence une section d'aire constante de son entrée à sa sortie.

La différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal est de préférence créée par aspiration du côté de la sortie du canal.

Le front a de préférence une vitesse de progression dans le canal qui diminue avec le temps pendant la progression de la solution dans le canal, de préférence jusqu'à ce que le front atteigne la sortie du canal.

Le gaz est de préférence de l'air.

La mesure du signal électrique est de préférence effectuée alors que :

- la progression de la solution de l'entrée vers la sortie du canal est dans un régime stationnaire, et/ou

5 -le canal est rempli par la solution de l'entrée jusqu'à la sortie du canal.

Les électrodes sont de préférence situées dans une deuxième moitié du canal à partir de l'entrée du canal.

10 Le procédé selon l'invention peut comprendre en outre, à partir de la mesure du signal électrique, un calcul d'une donnée de discrimination plaquettaire.

15 Les moyens de mesure, de préférence, imposent une intensité électrique entre les électrodes et mesurent une tension entre les électrodes pendant que l'intensité électrique est imposée, cette intensité électrique étant de préférence constante pendant la mesure.

Le procédé selon l'invention peut comprendre une intégration, dans le temps, de la tension mesurée.

Le procédé selon l'invention peut comprendre :

20 - une détection, de préférence par des photodiodes, du passage du front entre les électrodes et la sortie du canal, et/ou

- une mesure, de préférence par des photodiodes, d'une vitesse de la solution dans le canal, et un calcul, par des moyens techniques de traitement, d'une viscosité de la solution en fonction de la vitesse mesurée.

25 Le procédé selon l'invention peut comprendre une stabilisation en température du canal, de préférence à une température comprise entre 36°C et 38 °C.

La solution est de préférence un échantillon sanguin provenant d'un prélèvement sur un homme ou un animal.

30 Le procédé selon l'invention ne comprend de préférence pas d'ajout d'activateur plaquettaire à l'échantillon sanguin tel que prélevé.

Description des figures et modes de réalisation

D'autres avantages et particularités de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée de mises en œuvre et de modes de réalisation nullement limitatifs, et des dessins annexés suivants :

- 5 - la figure 1 est une vue schématique de dispositif 1 utilisé pour mettre en œuvre un mode de réalisation de procédé selon l'invention, ledit dispositif 1 comprenant une cartouche 5 et des moyens de mesure 10,
- la figure 2 est une vue en perspective de la cartouche 5 du dispositif 1, cette cartouche 5 comprenant un canal 2 prévu pour se remplir d'une
10 solution,
- la figure 3 illustre la variation du taux de cisaillement de la solution sur des parois internes du canal 2, en fonction de la distance entre l'entrée 3 du canal 2 et le front solution/gaz,
- la figure 4 illustre la variation de la vitesse du front solution/gaz, en
15 fonction de la distance entre l'entrée 3 du canal 2 et le front solution/gaz,
- la figure 5 est un schéma d'une carte électronique des moyens de mesure 10, et
- la figure 6 illustre différentes valeurs moyennes de la donnée de discrimination plaquettaire (intégration du signal de tension) pour
20 différentes populations (sujets sains, patients traités par monothérapies antiagrégantes plaquettaires et patients traités par bithérapies antiagrégantes plaquettaires).

Ces modes de réalisation n'étant nullement limitatifs, on pourra
25 notamment considérer des variantes de l'invention ne comprenant qu'une sélection de caractéristiques décrites ou illustrées par la suite isolées des autres caractéristiques décrites ou illustrées (même si cette sélection est isolée au sein d'une phrase comprenant ces autres caractéristiques), si cette sélection de caractéristiques est suffisante pour conférer un avantage
30 technique ou pour différencier l'invention par rapport à l'état de la technique antérieure. Cette sélection comprend au moins une caractéristique de préférence fonctionnelle sans détails structurels, et/ou avec seulement une partie des détails structurels si cette partie uniquement est suffisante pour

conférer un avantage technique ou à différencier l'invention par rapport à l'état de la technique antérieure.

5 On va tout d'abord décrire, en référence aux figures 1 à 6, un mode de réalisation préférentiel de procédé selon l'invention.

Le type de dispositif 1 utilisé pour mettre en œuvre le mode de réalisation de procédé selon l'invention correspond au type général de dispositif tel que décrit dans la demande WO2009/053841.

10 Ce mode de réalisation de procédé selon l'invention comprend une réalisation, dans un canal 2 du dispositif utilisé 1, d'un vide primaire (typiquement d'environ 5 kPa par rapport à la pression atmosphérique ou à la pression environnant le dispositif utilisé).

15 Ce mode de réalisation de procédé selon l'invention de caractérisation d'un échantillon sanguin, comprend une insertion, dans le canal 2 (encore soumis au vide primaire), d'une solution comprenant des plaquettes sanguines (typiquement de 30 μ l à 200 μ l de solution).

Le canal 2 comprend une entrée 3 (consistant typiquement en un perçage de 1 mm de diamètre) et une sortie 4, la solution étant insérée par l'entrée 3 du canal 2.

20 La sortie 4 du canal débouche sur un réservoir 22, qui sert à stocker la solution sanguine afin que la solution sanguine ne s'échappe pas de la cartouche 5 pour des raisons d'hygiène et de sécurité.

Le canal 2 est plus précisément un capillaire.

25 La solution est une solution de sang total non dilué comprenant des plaquettes sanguines.

30 La solution est un échantillon sanguin provenant d'un prélèvement réalisé sur un homme ou un animal, le procédé ne comprenant pas d'ajout d'activateur plaquettaire (tel que l'adénosine diphosphate (ADP), de l'acide arachidonique, du collagène, de la sérotonine, de la thrombine, etc.) à l'échantillon sanguin tel que prélevé.

Le canal 2 est réalisé dans une cartouche 5 (qui peut être monobloc ou résulter d'une superposition de plusieurs plaques), de préférence dans un matériau plastique (typiquement du polytéréphtalate d'éthylène, et/ou du polycarbonate).

Par exemple, la cartouche 5 est un assemblage :

- d'une plaque supérieure en polycarbonate transparent pour suivre la circulation de la solution dans le canal 2 et le réservoir 22 qui sont usinés sur une des faces de cette plaque supérieure, et
- 5 - d'une plaque inférieure en PC Xantar 3730 LDS Noir, un polycarbonate contenant des particules de cuivre activables par laser pour permettre le dépôt électrolytique des électrodes décrites par la suite,

ces deux plaques étant scellées hermétiquement ensemble (par exemple
10 par collage ou par soudure laser) pour maintenir l'étanchéité du canal 2 et supporter des pressions de 5 à 10 kPa.

Le canal 2 a une longueur (entre son entrée 3 et sa sortie 4) de 260 mm.

Le canal 2 a une forme de serpent in avec plusieurs boucles
15 typiquement trois à dix-neuf boucles

Le canal 2 a une aire de section interne qui est constante de son entrée 3 à sa sortie 4.

Le canal 2 a une section d'aire constante de son entrée 3 à sa sortie 4, typiquement de forme carrée, rectangulaire ou ronde ou ovale. Sa
20 section a un diamètre et/ou une largeur et/ou une hauteur typiquement supérieur à 50 μm et/ou inférieur à 900 μm .

Dans cet exemple particulier, le canal 2 a une section rectangulaire de 320 μm de hauteur sur 350 μm de largeur.

Ce mode de réalisation de procédé selon l'invention comprend en
25 outre une création d'une différence de pression entre l'entrée 3 et la sortie 4 du canal 2, de manière à faire progresser la solution de l'entrée 3 vers la sortie 4 du canal 2.

La différence de pression entre l'entrée 3 et la sortie 4 du canal 2 est créée par aspiration du côté de la sortie 4 du canal 2.

30 Les moyens 7 utilisés pour créer cette différence de pression assurent une évolution de la vitesse du front solution/gaz dans le canal 2 par régulation de la dépression ΔP en aval à la sortie 4, la pression amont à l'entrée 3 étant la pression atmosphérique. Les moyens 7 comprennent par exemple une pompe à vide (de référence KNF NMP05M de 6 VDC) et deux

électrovannes (LFVA__50210H THE LEE CO, ESSEX). La pression limite que peut fournir le système est de 70 kPa absolu environ (-30 kPa par rapport à la pression atmosphérique). La régulation de la pression d'aspiration est précise à 0,5 kPa autour de seuil de consigne de pression fixé pour avoir
5 une pression différentielle de 5 kPa par rapport à la pression atmosphérique du jour de la mesure.

Le réservoir 22 est relié d'un côté à la sortie 4 et d'un autre côté à un passage 44 (qui est typiquement un trou ou canal) de communication avec les moyens 7.

10 Le dispositif 1 comprend, de manière optionnelle, des moyens de détection « de mesure ». Ces moyens de détection comprennent par exemple une photodiode, et sont disposés dans ou orientés vers :

- la sortie 4 du canal 2, ou
- le réservoir 22, en étant plus proche de la sortie 4 que du passage
15 44.

Ces moyens de détection « de mesure » sont :

- agencés pour détecter un niveau déterminé de remplissage du réservoir 22 par la solution sanguine et/ou une arrivée de la solution sanguine par la sortie 4 du canal 2, et
- 20 - reliés à des moyens de mesure 10 d'un signal électrique qui sont déclenchés lorsque l'on détecte ce niveau déterminé de remplissage du réservoir 22 par la solution sanguine (par exemple 1/5^{ème} de remplissage) et/ou une arrivée de la solution sanguine par la sortie 4.

Ainsi, dans le procédé selon l'invention, on déclenche la mesure (par
25 les moyens de mesure 10) d'un signal électrique après (de préférence juste après) avoir détecté ce niveau déterminé de remplissage du réservoir 22 par la solution sanguine et/ou une arrivée de la solution sanguine par la sortie 4 du canal 2.

30 Le dispositif 1 comprend, de manière optionnelle, des moyens de détection « d'arrêt ». Ces moyens de détection comprennent par exemple une photodiode, et sont disposés dans ou orientés vers :

- le passage 44, ou

- le réservoir 22, en étant plus proche du passage 44 que de la sortie 4.

Ces moyens de détection « d'arrêt » sont :

- agencés pour détecter un niveau déterminé de remplissage du réservoir 22 par la solution sanguine et/ou une arrivée de la solution sanguine par le passage 44, et

- reliés à des moyens (la carte 13) qui commandent les moyens 7 utilisés pour créer la différence de pression, et qui sont agencés pour stopper la progression du front solution/gaz lorsque l'on détecte ce niveau déterminé de remplissage du réservoir 22 par la solution sanguine (par exemple 4/5^{ème} de remplissage) et/ou une arrivée de la solution sanguine par le passage 44.

Ainsi, dans le procédé selon l'invention, on stoppe la progression du front solution/gaz dans le canal 2 après (de préférence juste après) avoir détecté ce niveau déterminé de plus fort remplissage du réservoir 22 par la solution sanguine et/ou une arrivée de la solution sanguine par le passage 44.

La progression de la solution de l'entrée 3 vers la sortie 4 du canal 2 comprend une progression d'un front entre d'une part la solution s'étendant du front vers l'entrée 3 du canal 2 et d'autre part un gaz s'étendant du front vers la sortie 4 du canal 2.

Ce front est dans la présente description appelé « front » ou « front solution/gaz »

Ainsi, le front n'étant pas un front entre deux liquides différents, il n'y a pas de risque de diffusion aléatoire d'un liquide à un autre qui pourrait poser des problèmes de reproductibilité.

Le gaz est de l'air. Dans d'autres variantes, le gaz pourrait être quelconque, de préférence :

- un gaz neutre parmi hélium, néon, argon, krypton, xénon, et radon
- ou un mélange de ceux-ci, et/ou
- de l'oxygène O₂, et/ou
- de l'azote N₂, et/ou
- de l'hydrogène H₂, et/ou
- du dioxyde de carbone.

La solution a, lors du passage du front par l'entrée 3 du canal 2, un taux de cisaillement aux parois internes du canal 2 supérieur à $10\,000\text{ s}^{-1}$.

Dans la présente description, tous les taux de cisaillement γ_w aux parois internes du canal 2 sont supposés calculés avec la formule
5 suivante :

$$\gamma_w = \frac{\Delta P}{2\mu L \sqrt{\frac{\pi}{S}}}$$

qui est une approximation de type Poiseuille avec un coefficient de perte de charge, avec

ΔP la différence de pression $P_e - P_s$ entre la pression P_e à l'entrée 3
10 et la pression P_s à la sortie 4 du canal 2, cette différence (ou du moins la consigne de cette différence imposée aux moyens 7) étant constante et typiquement comprise entre 5 et 10 kPa

S l'aire de la section interne du canal 2, que cette section soit circulaire dans un modèle type Poiseuille ou, en première approximation,
15 carrée ou rectangulaire (de préférence avec de grands côtés du rectangle moins de deux fois plus grand que les petits côtés du rectangle) ou autre,

μ la viscosité dynamique de la solution (en Pa.s), théorique ou mesurée avec une viscosimètre de Couette

L la longueur du canal 2 entre son entrée 3 et :

- 20 - le front solution/gaz si la solution n'a pas encore atteint la sortie 4, ou
- la sortie 4 si la solution a atteint la sortie 4

La figure 3 illustre la variation du taux de cisaillement de la solution aux parois internes du canal 2, en fonction de la distance entre l'entrée 3 du
25 canal 2 et le front solution/gaz.

Comme illustré sur la figure 3, la solution a, pendant la progression de la solution de l'entrée 3 vers la sortie 4 du canal 2, un taux de cisaillement aux parois internes du canal qui diminue avec le temps, plus exactement pendant la progression du front de l'entrée 3 jusqu'à la sortie 4,
30 c'est-à-dire pendant un régime transitoire qui précède un régime stationnaire.

La solution a, lors du passage du front par la sortie 4 du canal 2, un taux de cisaillement aux parois internes du canal inférieur à 1000 s^{-1} .

En première approximation, à un instant donné (pour une position donnée du front dans le canal 2), le taux de cisaillement de la solution aux parois internes du canal 2 est constante de l'entrée 3 du canal 2 jusqu'au front, ou jusqu'à la sortie 4 si le canal 2 est intégralement rempli par la solution.

Ainsi, l'invention donne accès à des forts taux de cisaillement (supérieur à $10\,000 \text{ s}^{-1}$, sténose modérée), et à des faibles taux de cisaillement (inférieur à $1\,000 \text{ s}^{-1}$, valeur physiologique « normale »). L'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus sont principalement activées par un gradient de cisaillement. L'invention permet donc de mimer un intervalle de conditions allant des conditions physiopathologiques d'un vaisseau sténosé, où le gradient de cisaillement est le principal activateur des plaquettes qui forment le thrombus, aux conditions physiologiques d'un vaisseau sanguin sain. L'invention permet de stimuler les plaquettes par un gradient temporel de cisaillement sans ajout d'activateurs et la mesure du signal électrique sur chaque paire 18, 19 d'électrodes est effectuée à des cisaillements physiologiques.

La figure 4 illustre la variation de la vitesse du front solution/gaz, en fonction de la distance entre l'entrée 3 du canal 2 et le front solution/gaz.

Comme illustré sur la figure 4, le front a une vitesse de progression dans le canal 2 qui diminue avec le temps pendant la progression de la solution dans le canal 2, de préférence jusqu'à ce que la solution atteigne la sortie 4 du canal 2, plus exactement pendant la progression du front de l'entrée 3 jusqu'à la sortie 4, c'est-à-dire pendant le régime transitoire. Ainsi, l'invention donne accès à une variation de la vitesse d'écoulement. Ces conditions reflètent la diminution de vitesse d'écoulement du sang dans la circulation artérielle, de l'aorte vers les capillaires.

Ce mode de réalisation de procédé selon l'invention comprend un passage de la solution dans une zone de mesure du canal munie d'électrodes 8, 9 de préférence d'au moins une paire 18 ou 19 d'électrodes, ou même de plusieurs paires d'électrodes 18, 19.

Chaque paire 18 ou 19 d'électrodes est de préférence située au niveau d'une des boucles 6 du canal 2.

Les électrodes 8, 9 ont une bonne tenue à l'oxydation malgré de nombreux passages de sang, acides dilués de rinçage, sérum physiologique de rinçage, etc.

Les électrodes 8, 9 (situées à l'intérieur du canal 2), leurs pistes électroniques respectives 88, 99 et leurs connecteurs respectifs 28, 29 comprennent par exemple du platine et/ou de l'or, de préférence une couche supérieure de platine et/ou d'or en contact de la solution lors de la mesure de tension ci-après décrite.

Chaque électrode 8, 9, chaque piste 88, 99 et chaque connecteur 28, 29 est par exemple réalisé(e) par dépôt successif de trois couches de largeur 350 μm pour les électrodes, 300 μm pour les pistes et 800 μm pour les connecteurs:

- 5 μm à 8 μm d'épaisseur de cuivre, puis
- Un éventuel dopage au palladium (optionnel), puis
- 2 μm à 5 μm d'épaisseur de nickel, puis
- 0,05 à 0,1 μm d'épaisseur d'or.

Le dépôt électrolytique des électrodes 8, 9, des pistes électroniques 88, 99 et des connecteurs 28, 29 est réalisé par exemple par la technologie de structuration directe par laser (« Laser Direct Structuring » ou LDS-LPKF), par exemple par un Laser LPKF MicroLine 3D 160i piloté par le logiciel LPKF MicroLine 3D Office Software. La métallisation (Cuivre, Palladium, nickel, or) est ensuite effectuée par dépôts chimiques successifs.

Deux électrodes respectivement 8 ou 9 d'une même paire respectivement 18 ou 19 sont de préférence distantes d'un écartement de 100 μm à 4 mm, de préférence entre 300 μm et 1,5 mm, de préférence autour de 1mm.

Ce mode de réalisation de procédé selon l'invention comprend en outre une mesure, par lesdites électrodes 8, 9 et les moyens de mesure 10, d'un signal électrique alors que lesdites électrodes 8, 9 sont recouvertes par la solution dans le canal 2.

La différence de pression entre l'entrée 3 et la sortie 4 du canal 2 (ou du moins la consigne de cette différence de pression imposée aux moyens

7) est constante pendant la progression de la solution dans le canal 2, de préférence au moins jusqu'à ce que le front atteigne la sortie 4 du canal 2 et/ou jusqu'à la fin de la mesure du signal électrique par chaque paire 18 ou 19 d'électrodes.

5 La mesure du signal électrique est effectuée alors que :

- la progression de la solution de l'entrée 3 vers la sortie 4 du canal 2 est dans le régime stationnaire (vitesse moyenne de la solution et cisaillement de la solution aux parois internes du canal 2 constant en fonction du temps, ce régime stationnaire faisant suite au régime transitoire précédemment décrit), et

10

- le canal 2 est entièrement rempli par la solution de l'entrée 3 jusqu'à la sortie 4 du canal 2.

En effet, ce régime stationnaire démarre dès que le canal 2 est entièrement rempli par la solution de l'entrée 3 jusqu'à la sortie 4.

15

Dans ce régime stationnaire, la vitesse de la solution varie spatialement selon un profil de vitesse, plus rapide au centre de la section du canal 2 et plus lente sur les parois internes du canal 2, mais ce profil de vitesse est stable dans le temps pour n'importe quel point entre l'entrée 3 et la sortie 4.

20

Les électrodes 8 de la deuxième paire 18 sont situées dans une deuxième moitié (de préférence dans le dernier tiers) du canal 2 à partir de l'entrée 3 du canal 2 jusqu'à la sortie 4 du canal 2 ; autrement dit, les électrodes 8 sont situées entre le milieu de la longueur du canal 2 et la sortie 4 du canal 2 (de préférence entre les 2/3 de la longueur du canal 2 et

25

la sortie 4 du canal 2).

Ce mode de réalisation de procédé selon l'invention comprend en outre, à partir de la mesure du signal électrique, un calcul d'une donnée de discrimination plaquettaire par des moyens techniques de calcul 11. Cette donnée est une donnée quantifiée, par exemple un nombre réel sur une

30

échelle de un à dix.

Les moyens de calcul 11 comprennent uniquement des moyens techniques, typiquement des moyens électroniques (analogiques et/ou numériques), une unité centrale d'ordinateur, un processeur, et ou des moyens logiciels.

Les moyens de mesure 10 imposent (par une source de courant 12) une intensité électrique constante entre les électrodes 8, 9 de chaque paire 18, 19 et mesurent une tension entre les électrodes 8, 9 de chaque paire 18, 19.

5 L'intensité électrique a une forme constante en fonction du temps, typiquement une constante de 2 μA à 10 μA , de préférence autour de 5 μA . L'intensité reste constante pendant la mesure de tension, qui dure typiquement moins de 30 secondes, de préférence moins de 10 secondes, typiquement 5 secondes.

10 Le signal résultant pour chaque paire 18, 19 d'électrodes est une variation non linéaire de la tension mesurée en fonction du temps.

La mesure de tension pour chaque paire 18, 19 d'électrodes est synchronisée avec l'intensité électrique imposée à cette même paire 18, 19 d'électrodes de manière à mesurer la tension lorsque l'intensité est
15 constante.

Le schéma électronique d'une partie des moyens de mesure 10, illustré sur la figure 5, est une source de courant I dont l'amplitude et la forme dépendent de la forme de la tension d'entrée V_e . Chaque paire 19, 18 est associée à un amplificateur opérationnel dont la tension de sortie respectivement V_{S1} ou V_{S2} est égale à la différence de potentiel aux bornes de la paire d'électrodes respectivement 9 ou 8. Chaque sortie V_{S1} ou V_{S2} de
20 cette carte 10 est reliée à une carte d'acquisition 13.

La carte d'acquisition 13 est par exemple une carte de chez National Instruments (de référence « High-Speed M Series Multifunction DAQ for
25 USB - 16-Bit, up to 1.25 MS/s, Integrated BNC Connectivity ») qui comporte un convertisseur analogique-numérique (CAN) 16 bits, un multiplexeur huit voies (fréquence échantillonnage maximale 1,25 MHz) et deux convertisseurs numérique-analogiques (CNA) 16 bits (2 MHz pour deux voies). Dans une variante plus compacte, la carte 13 est remplacée par un
30 microcontrôleur.

La carte 10, le générateur 12 et la carte 13 sont programmés par les moyens de calcul 11 (ordinateur) par exemple via MatLab ou le logiciel libre Scilab .

Ce mode de réalisation de procédé selon l'invention comprend une intégration, dans le temps (typiquement sur quelques secondes, typiquement sur 2 à 20 secondes, de préférence entre $t=3s$ et $t=5s$, $t=0s$ correspondant au début de l'imposition de l'intensité constante) de la tension mesurée pour chaque paire 18, 19 d'électrodes.

Cette intégration peut être réalisée directement par les moyens de mesure 10, ou en post-traitement par les moyens de calcul 11.

La valeur de cette intégration est directement proportionnelle à la donnée de discrimination plaquettaire, qui est une donnée dont la valeur permet de discriminer des plaquettes fonctionnant normalement, c'est-à-dire très réactives aux contraintes de cisaillement et des plaquettes ne fonctionnant pas normalement c'est-à-dire plus faiblement réactives aux contraintes de cisaillement, et permet de discriminer par exemple:

- les patients traités par antiagrégants plaquettaires des sujets sains, et/ou
- les patients traités par monothérapies antiagrégantes de ceux traités par bithérapies antiagrégantes, et/ou
- les patients traités par bithérapies antiagrégantes de ceux traités par trithérapies antiagrégantes.

Ceci est illustré sur la figure 6, dans un exemple où des patients traités par monothérapies étaient traités par du prasugrel ou du clopidogrel et des patients traités par bithérapies étaient traités par aspirine et prasugrel ou aspirine et clopidogrel.

Dans cet exemple, on a vérifié que la variation de valeur de cette intégration n'est pas un artefact de mesure ou du bruit de mesure, mais correspond bien à des variations d'agrégation plaquettaire à la surface d'électrodes. Pour cela, on a imagé par microscopie électronique à balayage (MEB), l'agrégation de plaquettes sur les électrodes 8. Après la mesure de tension sur la paire d'électrodes 8, les protéines plasmatiques et les cellules sanguines non adhérentes sont éliminées par un lavage du canal 2 avec une solution de Tyrode-Hepes-BSA (NaCl 135 mM, KCl 4 mM, MgCl₂ 2 mM, NaH₂PO₄ 0.9 mM, glucose 2.5 mM, pyruvate 2.5 mM, Hépès 10 mM pH 7.35 et albumine de sérum bovin (BSA) 0.35%) pendant 1 minute. Les deux plaques de la cartouche sont dissociées et la plaque inférieure en PC Xantar

3730 LDS Noir avec les électrodes est immédiatement plongée dans le fixateur (tampon phosphate 0.1 M et glutaraldéhyde 2%). Elle y est maintenue deux heures à température ambiante puis lavée une fois par du tampon phosphate 0.2 M. Après fixation, cette plaque inférieure est conservée dans le tampon phosphate au maximum 24 h. Le matériel biologique sur cette plaque inférieure est déshydraté par des passages successifs dans des bains d'éthanol ou d'acétone de concentrations croissantes. Le matériel biologique sur cette plaque inférieure est séché par dessiccation à l'héxaméthylsilasane. Le matériel biologique sur cette plaque inférieure est recouvert d'une fine couche d'or (20-40 nm) par pulvérisation cathodique (Scancoat Six, Edwards). La métallisation a pour but de rendre l'échantillon conducteur aux électrons évitant ainsi l'accumulation des charges parasites négatives à sa surface au cours de l'observation. Pour l'observation, le morceau de plaque métallisée est introduit dans l'enceinte sous vide secondaire du MEB (Microscope Electronique à Balayage à filament tungstène Stereoscan 260, Cambridge et système d'acquisition numérique).

Pour la mesure, la cartouche microfluidique 5 est connectée (du côté de connecteurs respectivement 28, 29 reliées aux pistes électroniques respectivement 88, 99 des électrodes respectivement 8, 9) :

- à la source 12 d'intensité électrique
- aux moyens de mesure 10 de la tension et
- aux moyens de calcul 11.

Les moyens 7 pour créer la différence de pression entre l'entrée 3 et la sortie 4 du canal 2 sont aussi connectés aux moyens de mesure 10 et aux moyens de calcul 11.

La carte d'acquisition 13 est connectée aux moyens de mesure 10 et aux moyens de calcul 11.

Ce mode de réalisation de procédé selon l'invention comprend en outre une détection, de préférence par des photodiodes non illustrées (de préférence un couple de photodiodes) disposées latéralement au canal 2, du passage du front dans le canal 2 (devant les photodiodes) entre les électrodes 8 et la sortie 4 du canal 2.

La détection du passage du front par les photodiodes est envoyée aux moyens de mesure 10 pour s'assurer que les moyens de mesure 10 attendent bien que le canal 2 soit intégralement rempli et que le réservoir 22 soit partiellement rempli (au $1/10^{\text{ème}}$ par exemple) avant de mesurer le signal électrique entre les électrodes 8 et/ou les électrodes 9.

Ce mode de réalisation de procédé selon l'invention comprend en outre :

- une mesure, de préférence par les photodiodes non illustrées (de préférence un couple de photodiodes) disposées latéralement au canal 2 (de préférence au-dessus ou au-dessous de la cartouche 1), d'une vitesse de la solution (de préférence du front) dans le canal 2 (devant les photodiodes) entre les électrodes 8 et la sortie 4 du canal 2, et
- un calcul, par des moyens techniques de traitement (par exemple par les moyens de calcul 11), d'une viscosité de la solution en fonction de la vitesse mesurée.

Il est assez difficile de mesurer une vitesse avec les photodiodes quand le canal 2 est plein.

Ainsi, on mesure de préférence la vitesse moyenne du front entre deux points, chaque point correspondant à une position d'une des photodiodes. Les points sont de préférence situés à proximité de la sortie 4 du canal 2, là où la variation de vitesse du front entre ces deux points est faible. Avec deux photodiodes espacées de 2 à 10mm par exemple on mesure la vitesse sous un ΔP constant et connu. Ceci permet de remonter à la viscosité moyenne de la solution avec la formule de Poiseuille.

L'évaluation de la viscosité sanguine est un critère supplémentaire pour évaluer le bénéfice/risque des bithérapies/trithérapies antiplaquettaires.

Ce mode de réalisation de procédé selon l'invention comprend une stabilisation en température du canal 2 et de la cartouche 5, de préférence à une température comprise entre 36°C et 38 °C, de préférence entre 36,5°C et 37,5 °C. Cela améliore la reproductibilité des mesures, car la viscosité de la solution dépend de la température. Pour cela, la cartouche 5

dans laquelle est réalisé le canal 2 est typiquement en contact d'un thermostat (intégré dans un support portant la cartouche 1, avec une résistance chauffante et/ou un module Peltier), agencé pour fonctionner en refroidissement comme en chauffage.

5

Bien sûr, l'invention n'est pas limitée aux exemples qui viennent d'être décrits et de nombreux aménagements peuvent être apportés à ces exemples sans sortir du cadre de l'invention.

Par exemple, dans des variantes combinables entre elles :

10

- le procédé est mis en œuvre uniquement avec les électrodes 8:

- o soit dans le dispositif 1,
- o soit dans une variante du dispositif 1 ne comprenant pas les électrodes 9.

15

- la mesure peut être effectuée avec les électrodes 8 alors que les électrodes 9 sont passives. De manière générale, il peut y avoir, entre l'entrée 3 et les électrodes de mesure 8, une ou plusieurs tache(s) ou dépôt(s) 9 d'or ou de platine dans le canal 2, chaque tache ou dépôt 9 étant agencé(e) pour être au contact de la solution sanguine remplissant le canal 2.

20

Bien entendu, les différentes caractéristiques, formes, variantes et modes de réalisation de l'invention peuvent être associées les unes avec les autres selon diverses combinaisons dans la mesure où elles ne sont pas incompatibles ou exclusives les unes des autres. En particulier toutes les variantes et modes de réalisation décrits précédemment sont combinables

25

entre eux.

REVENDEICATIONS

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 1.** Procédé de caractérisation d'un échantillon sanguin, comprenant :
 - une insertion dans un canal (2) d'une solution comprenant des plaquettes sanguines, ledit canal comprenant une entrée (3) et une sortie (4), la solution étant insérée par l'entrée du canal,
 - une création d'une différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal, de manière à faire progresser la solution de l'entrée vers la sortie du canal,
 - un passage de la solution dans une zone de mesure du canal munie d'électrodes (8),
 - une mesure, par lesdites électrodes et des moyens de mesure (10), d'un signal électrique alors que lesdites électrodes sont recouvertes par la solution dans le canal,caractérisé en ce que la progression de la solution de l'entrée vers la sortie du canal comprend une progression d'un front entre d'une part la solution s'étendant du front vers l'entrée du canal et d'autre part un gaz s'étendant du front vers la sortie du canal.

 - 2.** Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la solution a, lors du passage du front par l'entrée du canal, un taux de cisaillement aux parois internes du canal supérieur à $10\ 000\ \text{s}^{-1}$.

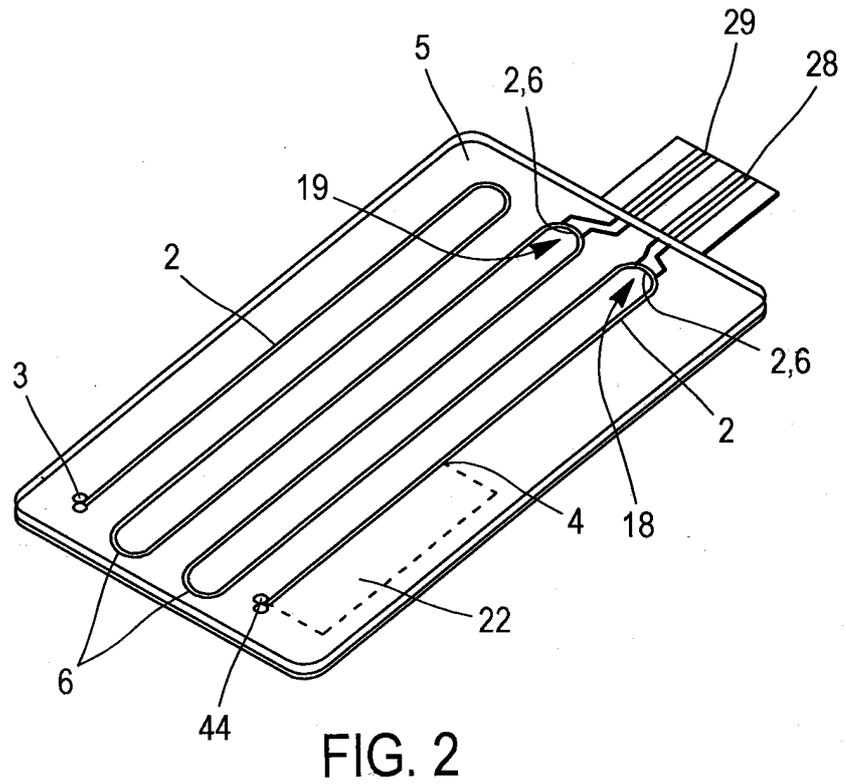
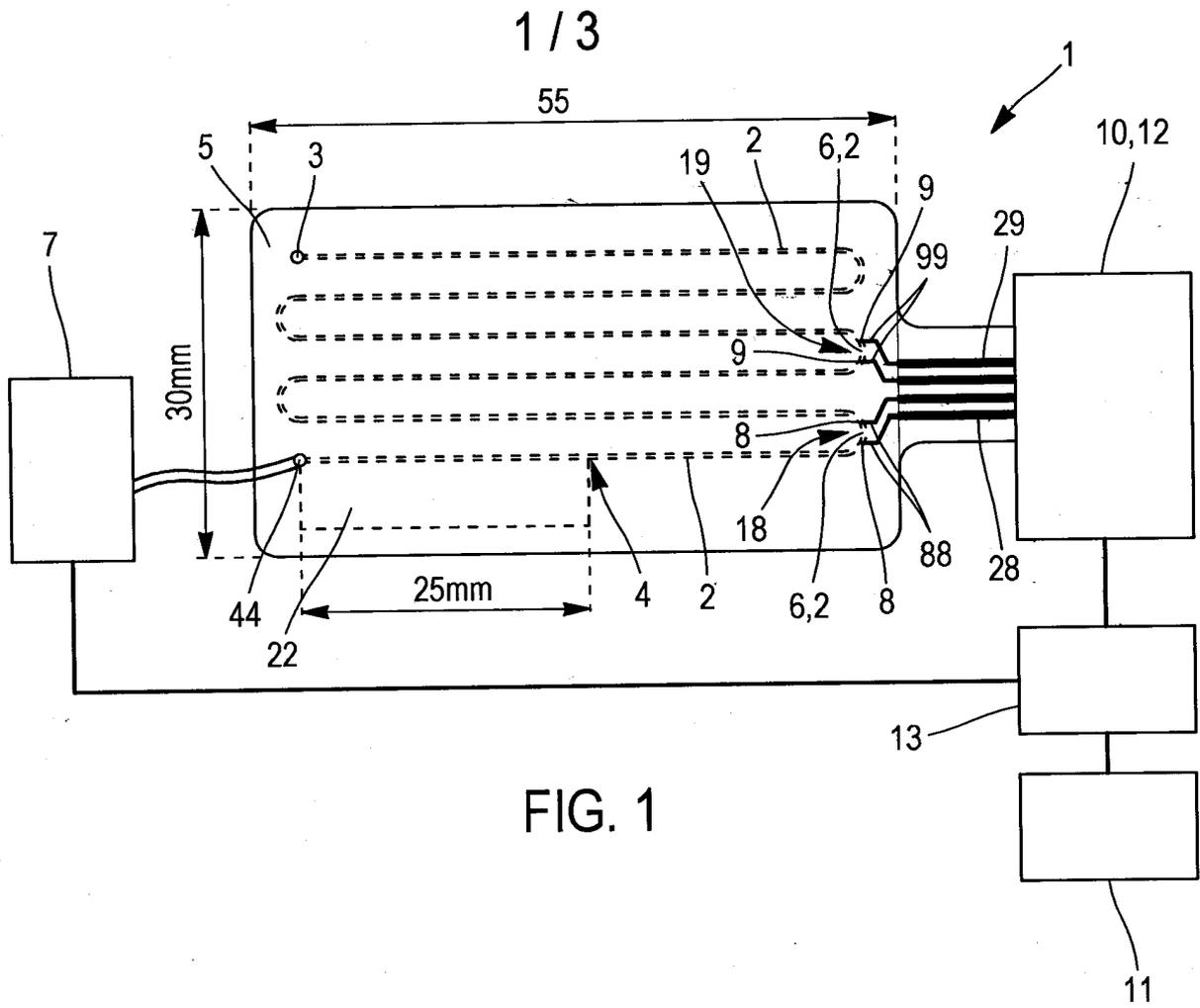
 - 3.** Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la solution a, pendant la progression du front de l'entrée vers la sortie du canal, un taux de cisaillement aux parois internes du canal qui diminue avec le temps, de préférence jusqu'à ce que le front atteigne la sortie du canal.

 - 4.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la solution a, lors du passage du front par la sortie du canal, un taux de cisaillement aux parois internes du canal inférieur à $1000\ \text{s}^{-1}$.

- 5
- 5.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal est constante pendant la progression de la solution dans le canal, de préférence au moins jusqu'à ce que le front atteigne la sortie du canal et/ou jusqu'à la mesure.
- 10
- 6.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le canal a une section d'aire constante de son entrée à sa sortie.
- 7.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal est créée par aspiration du côté de la sortie du canal.
- 15
- 8.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le front a une vitesse de progression dans le canal qui diminue avec le temps pendant la progression de la solution dans le canal, de préférence jusqu'à ce que le front atteigne la sortie du canal.
- 20
- 9.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le gaz est de l'air.
- 10.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la mesure du signal électrique est effectuée alors que la progression de la solution de l'entrée vers la sortie du canal est dans un régime stationnaire, ledit canal étant rempli par la solution de l'entrée jusqu'à la sortie du canal.
- 25
- 11.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les électrodes (8) sont situées dans une deuxième moitié du canal à partir de l'entrée du canal.
- 30
- 12.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre, à partir de la mesure du
- 35

signal électrique, un calcul d'une donnée de discrimination plaquettaire.

- 5 **13.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les moyens de mesure imposent une intensité électrique constante entre les électrodes et mesurent une tension entre les électrodes pendant que l'intensité électrique est imposée.
- 10 **14.** Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend une intégration, dans le temps, de la tension mesurée.
- 15.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend :
- 15 - une détection, de préférence par des photodiodes, du passage du front entre les électrodes et la sortie du canal, et/ou
- une mesure, de préférence par des photodiodes, d'une vitesse de la solution dans le canal, et un calcul, par des moyens techniques de traitement, d'une viscosité de la solution en fonction de la vitesse mesurée.
- 20 **16.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une stabilisation en température du canal, de préférence à une température comprise entre 36°C et 38 °C.
- 25 **17.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la solution est un échantillon sanguin provenant d'un prélèvement sur un homme ou un animal, le procédé ne comprenant pas d'ajout d'activateur plaquettaire à l'échantillon sanguin tel que prélevé.



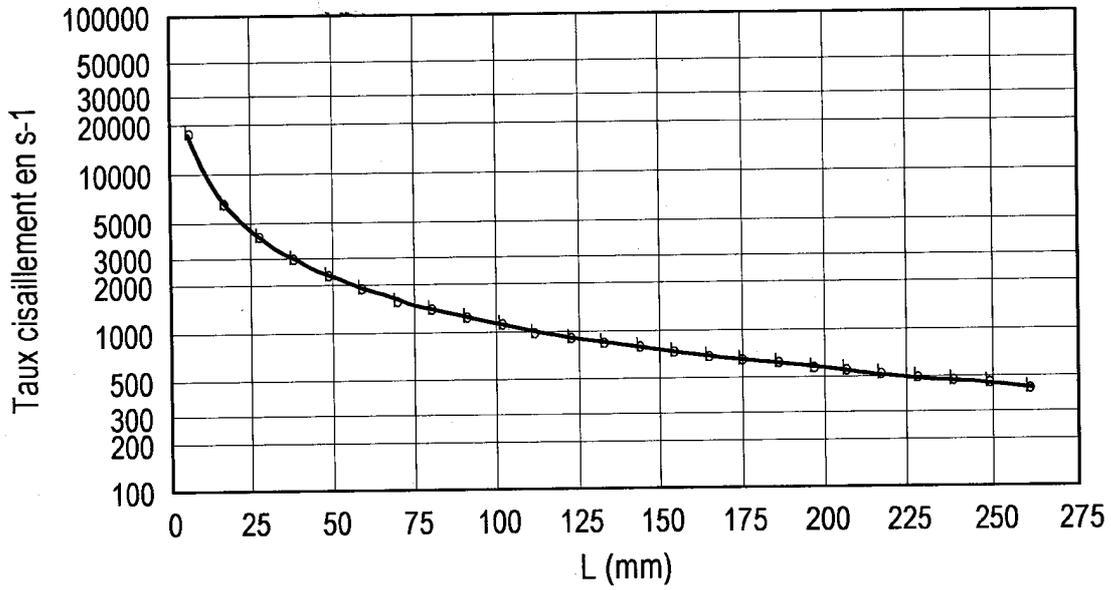


FIG. 3

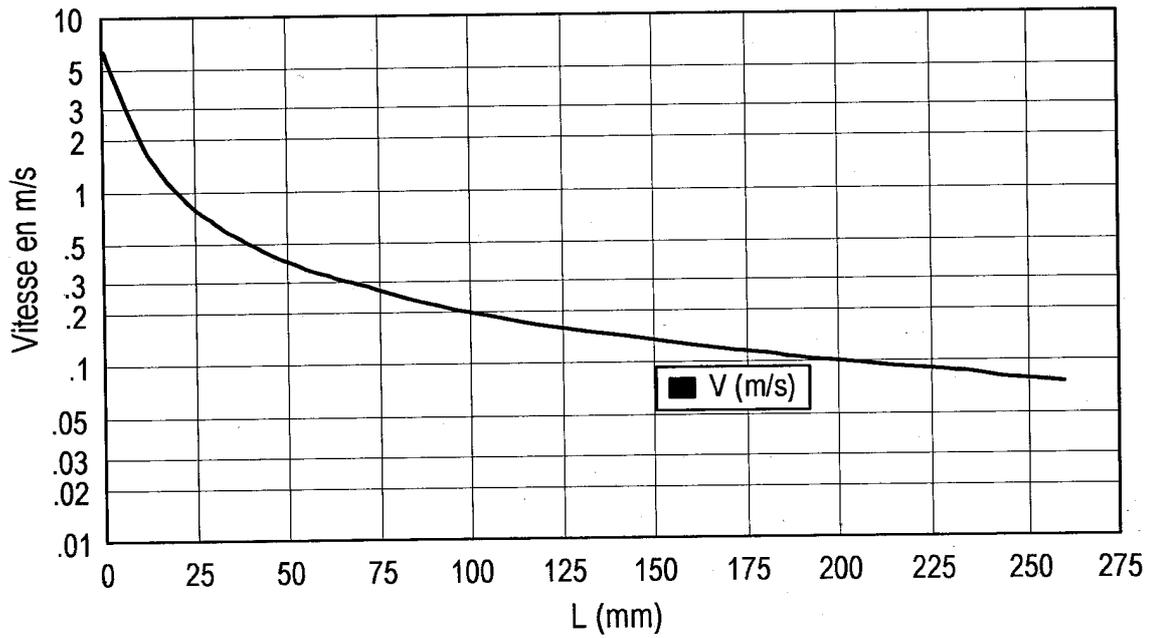


FIG. 4

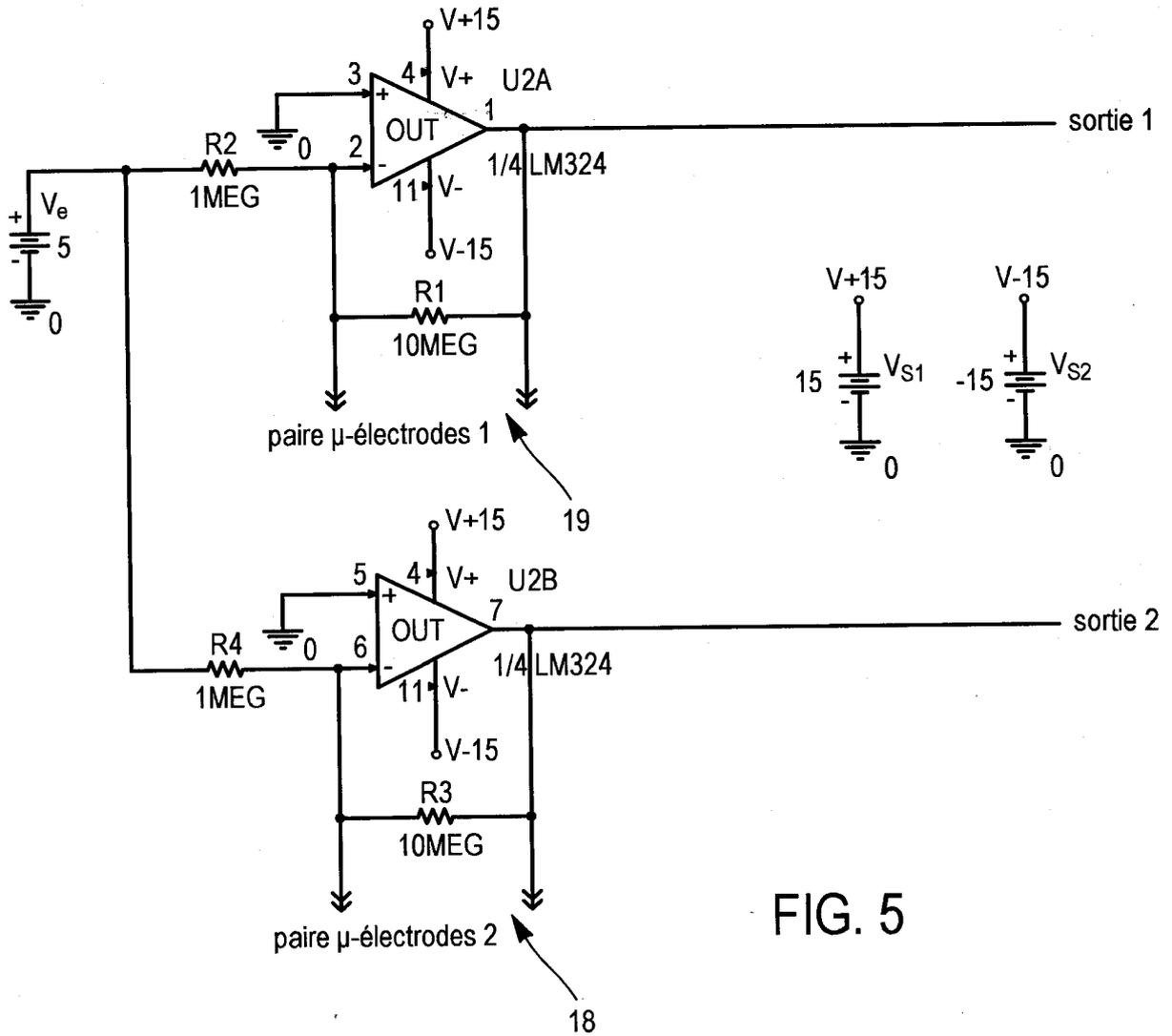


FIG. 5

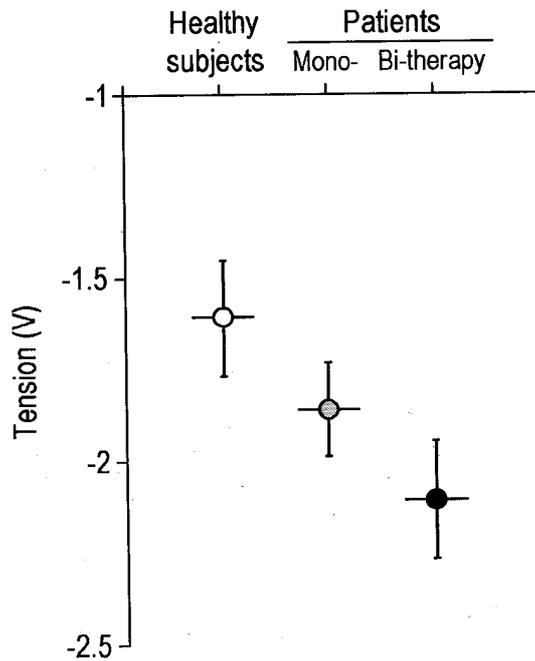


FIG. 6

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN
CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

EP 2 053 387 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR])
29 avril 2009 (2009-04-29)

US 2013/083311 A1 (LI MELISSA [US] ET AL)
4 avril 2013 (2013-04-04)

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN
TECHNOLOGIQUE GENERAL**

NEANT

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT