(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 638 849**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **88 14421**

(51) Int Cl⁵ : G 01 N 33/533, 15/14, 33/543; C 12 Q 1/04.

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt** : 4 novembre 1988.

(30) **Priorité** :

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande** : BOPI « Brevets » n° 19 du 11 mai 1990.

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés** :

(71) **Demandeur(s)** : *Société dite : CHEMUNEX, Société anonyme.* — FR.

(72) **Inventeur(s)** : Michel Van Hoegaerden.

(73) **Titulaire(s)** :

(74) **Mandataire(s)** : Cabinet Ores.

(54) Procédé d'amplification d'un signal fluorescent pour la recherche spécifique de la présence éventuelle de particules et application à la détection et à la numération desdites particules.

(57) Ce procédé, selon l'invention, mettant en œuvre des structures fluorescentes, dénommées ci-après billes, aptes à fixer un antiligand approprié, est caractérisé en ce que lesdites billes, lesquelles présentent un diamètre et/ou une densité de fluorochrome et/ou une longueur d'onde d'émission identiques ou différents et sur lesquelles est fixé au moins un antiligand approprié, sont mises en contact avec l'échantillon à analyser, de manière à obtenir des complexes formés de nombreuses billes fluorescentes fixées sur chaque particule à détecter, puis en ce que, dans un deuxième temps, le comptage individuel des particules à détecter ainsi marquées est réalisé à l'aide d'un moyen de détection de fluorescence approprié choisi dans le groupe qui comprend le microscope, les cytomètres en flux, les analyseurs d'image et les systèmes à balayage laser.

FR 2 638 849 - A1

Vente des fascicules à l'IMPRIMERIE NATIONALE, 27, rue de la Convention — 75732 PARIS CEDEX 15

La présente invention est relative à un procédé d'amplification d'un signal fluorescent pour la recherche et la numération spécifiques, très rapide et sensible, dans un milieu liquide ou semi-liquide, de la présence éventuelle de particules d'origine biologique, même présentes en quantité extrêmement faible, ainsi qu'à l'application dudit procédé à la détection et à la numération de particules.

Par quantité extrêmement faible, on entend, au sens de la présente invention un très petit nombre de particules, qui peut être aussi faible qu'une seule particule.

L'analyse qualitative et l'analyse quantitative rapides de la présence de particules dans des produits alimentaires, des produits d'hygiène ou des fluides, des fluides biologiques par exemple, notamment dans le cadre de l'analyse biologique, s'avèrent très utiles et importantes dans les différentes industries concernées (industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques, notamment dans le cadre du contrôle de qualité et également laboratoires d'analyse médicale).

En ce qui concerne en particulier les micro-organismes tels que bactéries, levures, moisissures, parasites, virus, phages, on utilise habituellement comme technique de détection, la mise en culture d'un échantillon du produit à tester.

Cette méthode de détection a l'inconvénient d'être longue à mettre en oeuvre, les micro-organismes éventuellement présents se développant en colonies visibles ou se multipliant en nombre suffisant pour modifier un paramètre physico-chimique, dans un délai de 2 à 30 jours. De plus, la numération de micro-organismes par ces méthodes n'est absolument pas précise et ne permet qu'une évaluation approximative du nombre de micro-organismes présents au départ ; l'identification des micro-organismes, par cette méthode, reste partielle.

Il est également connu de marquer les particules au moyen de colorants chimiques ou biologiques ; on connaît en particulier de nombreux colorants chimiques ou biologiques pour le marquage de micro-organismes ou de cellules animales ou végétales : notamment les colorants des acides nucléiques, les fluorochromes tels que les dérivés de la fluorescéine et de la phycoérythrine, qui sont utilisés depuis de nombreuses années, directement ou à travers leur couplage à un antiligand, des anticorps notamment.

On entend par antiligand, la structure moléculaire capable de reconnaître et de fixer la/les particules à détecter et/ou un ligand présent à la surface de ladite particule.

Les Demandes de brevet français n° 88 0236 et n° 88 02937, au nom de la Demanderesse, décrivent le comptage de particules rendues fluorescentes à l'aide d'un colorant de viabilité positive et/ou d'autres substances telles que des colorants vitaux, des anticorps rendus fluorescents et des sondes nucléiques rendues fluorescentes, le comptage individuel desdites particules étant notamment réalisé par cytométrie en flux ou par balayage laser.

De telles méthodes rendent difficiles la détection et le comptage de particules de taille plus petite que la longueur d'onde d'excitation. Elles ne permettent pas non plus la détection d'un ligand tel qu'un épitope ou déterminant antigénique présent en très petites quantités à la surface de ladite particule.

A l'heure actuelle, une particule antigénique est indétectable en cytométrie en flux, au moyen des appareils disponibles sur le marché, si la quantité de déterminants antigéniques à la surface de ladite particule est inférieure à environ 3 000, comme cela est précisé notamment dans l'article de TRUNEH A. et al., paru dans Cytometry, (1987, 8, 562-567 : "Detection of very low receptor numbers on cells by flow cytometry using a sensitive staining method"). En effet, il y a une limite inférieure au

nombre de molécules fluorescentes qui peuvent être détectées par cytométrie en flux et qui a été estimée à 3 000 - 5 000 molécules/cellule.

En conséquence, l'invention s'est donné pour but de pourvoir à un procédé d'amplification du signal de fluorescence pour la recherche, la détection et la numération de particules, très rapide et facile à mettre en oeuvre, notamment dans le cadre d'analyse de routine, sensible, spécifique et peu coûteux et permettant également le comptage à l'unité près desdites particules même lorsque celles-ci sont très petites et/ou présentent un petit nombre de ligands à leur surface.

La présente invention a pour objet un procédé d'amplification de signal pour la recherche, la détection et la numération de particules présentes normalement ou éventuellement contenues en tant que contaminants dans un milieu à l'état liquide, semi-liquide, gélifié, pâteux, solide ou analogue, notamment des produits alimentaires, des produits d'hygiène, des fluides biologiques, en particulier dans le cadre de l'analyse biologique, mettant en oeuvre des structures fluorescentes, dénommées ci-après billes, aptes à fixer un antiligand approprié, ledit procédé étant caractérisé en ce que lesdites billes, lesquelles présentent un diamètre et/ou une densité de fluorochrome et/ou une longueur d'onde d'émission identiques ou différents et sur lesquelles est fixé au moins un antiligand approprié, sont mises en contact avec l'échantillon à analyser, de manière à obtenir des complexes formés de nombreuses billes fluorescentes fixées sur chaque particule à détecter, puis en ce que, dans un deuxième temps, le comptage individuel des particules à détecter ainsi marquées est réalisé à l'aide d'un moyen de détection de fluorescence approprié choisi dans le groupe qui comprend le microscope, les cytomètres en flux, les analyseurs d'image et les systèmes à balayage laser.

Les billes fluorescentes sur lesquelles est fixé l'antiligand sont dénommées ci-après, système d'amplification.

On entend par population de billes, un ensemble de billes identiques, c'est-à-dire dont le diamètre, la densité en fluorochrome, la longueur d'onde d'émission ainsi que l'antiligand fixé à leur surface sont identiques.

On entend par couleur de billes, la longueur d'onde d'émission caractéristique d'une population.

Un tel procédé d'amplification permet d'obtenir l'équation : un épitope <--> une bille fluorescente, celle-ci correspondant à 10^4-10^8 fluorochromes, alors que dans les conditions décrites dans l'Art Antérieur on a : un épitope <--> un anticorps, celui-ci correspondant à 1 à 3 fluorochromes.

Lorsqu'on détecte lesdites billes fluorescentes, libres et/ou fixées sur les particules à rechercher, à l'aide d'un cytomètre en flux, la forme de la cellule en flux est choisie pour réduire à leur minimum les forces hydrodynamiques d'arrachage.

Le cytomètre en flux qui peut être utilisé dans le cadre de la présente invention est avantageusement, mais de manière non limitative, celui décrit dans la Demande de Brevet français n° 88 02937 citée ci-dessus : il permet de passer des échantillons de volumes importants, possède un système de lavage automatique entre chaque échantillon, et est conçu pour une utilisation en routine ; il est, de plus, capable de détecter, de déterminer la couleur et de compter chaque particule individuellement, jusqu'à une fréquence de 3 000 par seconde.

Conformément à l'invention, l'antiligand fixé sur lesdites billes est choisi dans le groupe qui comprend des antigènes, des anticorps, des récepteurs, des lectines, des protéines du type A ou G et des avidines spécifiques des particules à rechercher.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, les anticorps sont choisis dans le groupe qui comprend les anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux, mono ou polyspécifiques anti-levures et/ou anti-bactéries et/ou anti-moisissures et/ou anti-parasites et/ou anti-virus et/ou anti-phage et/ou anti-cellules animales et/ou anti-cellules végétales.

Selon un autre mode de mise en oeuvre dudit procédé, les billes fluorescentes ont un diamètre inférieur à celui des particules à détecter.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, les billes ont un diamètre compris entre 0,05 µm et 5 µm.

Les billes fluorescentes peuvent être notamment des billes de latex, des billes en polyacrylamide, des billes de cellulose, des billes en polystyrène, des billes d'agarose, des billes en PVC, des billes de verre.

Un tel procédé permet, soit de ne détecter que les billes fluorescentes fixées sur la particule à rechercher, soit de détecter à la fois les billes isolées et les billes fixées sur la particule à rechercher, les différentes billes étant alors différenciées et reconnues par le moyen de détection.

Les particules à détecter sont choisies dans le groupe qui comprend les micro-organismes, notamment les levures, les bactéries, les moisissures, les parasites, les virus et les phages ainsi que les cellules animales ou végétales.

Le marquage desdites particules à l'aide de billes fluorescentes sur lesquelles est fixé au moins un antiligand approprié, a l'avantage de permettre la détection de particules trop petites pour être visibles au cytomètre en flux, ledit marquage permettant simultanément une amplification et une augmentation du signal de fluorescence, et une augmentation de la taille des particules à détecter.

Ce marquage a également l'avantage de permettre la détection et la numération simultanées de particules de types différents dans un même échantillon. Il permet également de rechercher en une seule étape, la présence éventuelle de plusieurs ligands différents sur une même particule.

Le procédé conforme à l'invention a également l'avantage de permettre un dosage homogène, c'est-à-dire, ne nécessitant ni la séparation physique d'autres particules éventuellement présentes dans l'échantillon à doser ou de billes fluorescentes non liées aux particules à rechercher, ni des étapes de lavage ; en effet, l'utilisation du système d'amplification conforme à l'invention, permet de travailler dans un milieu complexe, éventuellement turbide.

La présente invention a, en outre, pour objet un kit ou coffret prêt à l'emploi pour la mise en oeuvre du procédé d'amplification conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une population de billes fluorescentes sur lesquelles est fixé au moins un antiligand approprié, éventuellement associé à des tampons appropriés.

Conformément à l'invention, lorsque le kit comprend plusieurs populations de billes, celles-ci sont utilisées seules ou en mélange.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé, objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 : Recherche de levure dans un fluide biologique n'en contenant normalement pas :

a) Préparation du système d'amplification billes fluorescentes/anticorps :

- on mélange 300 µl de tampon à pH 9,2 avec 10 µl de billes fluorescentes carboxylées (suspension à 2,5 % diluée au 1/10).
- Soniquer 50 secondes ;
- Ajouter 300 µl d'anticorps approprié à environ 2,5 mg/ml, par exemple anti-levures ;
- Incuber 1/2 heure à température ambiante,
- Laver 3 fois avec du PBS/BSA/Tween 20,
- Centrifuger à 11 000 tr/mn pendant 10 minutes,
- Resuspendre dans un culot minimum (100 µl),
- Soniquer 50 secondes ;

b) Détection de l'antigène recherché :

- Ajouter à la suspension de billes obtenue en a), une quantité appropriée d'échantillon à analyser,
- Soniquer,
- Incuber 1 heure à température ambiante,
- Rechercher et compter les levures rendues fluorescentes au moyen d'un microscope (photo 1 et 2).

La photo 1 représente des levures *Candida albicans* recouvertes de billes de 0,23 µm de diamètre, sur lesquelles a été couplé de façon covalente un anticorps monoclonal anti-*Candida albicans* d'isotype G.

La photo 2 représente des levures *Candida tropicalis* recouvertes de billes de 0,51 µm de diamètre, sur lesquelles a été couplé de façon covalente un anticorps monoclonal multi-générique anti-levures (Demande de brevet 86 01620 au nom de la Demanderesse) d'isotype M.

Exemple 2 : Numération de bactéries dans un fluide en contenant normalement (fermentation, par exemple) :

a) Protocole identique à celui de l'exemple 1, le diamètre des billes est de 0,2 µm et l'anticorps est dirigé contre la bactérie utilisée.

b) Détection de l'antigène recherché :

- Ajouter à la suspension obtenue en a), 100 µl d'une suspension de micro-organismes à 10^4/ml ou plus,
- Soniquer,
- Incuber 1 heure à température ambiante.
- Compter les bactéries rendues fluorescentes au moyen d'un cytomètre en flux.

Exemple 3 : Détermination de l'espèce ou du genre des particules à analyser.

.Une batterie d'anticorps monoclonaux couvrant les spécificités recherchées sont couplés à des billes de couleurs différentes (exemples : récepteurs membranaires de cellules animales, espèces du genre *Saccharomyces*). L'analyseur en flux multi-paramétrique (jusqu'à six couleurs différentes) recherche s'il y a eu fixation de billes ou non ; la couleur détectée identifie le (ou les) type(s) de particule(s) présente(s).

Exemple 4 : Recherche de la présence simultanée de plusieurs ligands sur une même particule :

Les antiligands correspondant aux différents ligands sont couplés à des billes fluorescentes de couleurs différentes, selon le protocole de l'exemple 1. L'analyse est réalisée au moyen du cytomètre en flux. La présence simultanée de deux (ou plusieurs) couleurs de fluorescence sur une même particule indique que celle-ci possède les deux (ou plus) ligands correspondants.

Exemple 5 : Recherche et quantification d'épitopes extrêmement rares à la surfaces de particules : lorsque le nombre d'épitopes accessibles portés par un cellule est inférieur à environ 3000, leur détection en cytométrie en flux devient très délicate, voire impossible. L'amplification par les billes fluorescentes permet la détection et la quantification précise de quelques dizaines d'épitopes. Théoriquement, le nombre minimal d'épitopes identiques détectables est de deux dans des conditions idéales.

Exemple 6 : Détection de spores de *Clostridium tyrobutyricum* dans les laits destinés à la fabrication des fromages :

Les spores de cette espèce sont extrêmement petites (moins d'1 µm) et le seuil minimal à détecter est très faible (idéalement 100 spores par litre).

a) Recherche par cytométrie en flux :

1) Le lait est centrifugé.

2) Le culot est repris dans un volume minimum de tampon contenant des billes fluorescentes de 0,2 µm de diamètre sur lesquelles les anticorps adéquats ont été fixés (voir exemple 1).

3) La recherche des billes agglutinées autour d'une spore est réalisée en cytométrie en flux, capable de compter les particules à l'unité près.

b) Recherche sur filtre :

1) Le lait est traité de façon connue, pour diminuer sa viscosité et augmenter sa filtrabilité.

2) Le lait traité est filtré sur membrane.

3) La membrane est incubée en présence d'une suspension de billes telles que décrites sous a2).

4) L'excès de liquide et de billes libres est délicatement chassé par le passage d'un volume d'air.

5) La recherche des spores rendues fluorescentes par la fixation spécifique des billes correspondantes est réalisée avantageusement par l'appareil décrit dans la Demande de brevet n° 88 02936 déposée au nom de la Demanderesse.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ces modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'applications qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse, au contraire, toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Procédé d'amplification de signal pour la recherche, la détection et la numération de particules présentes normalement ou éventuellement contenues en tant que contaminants dans un milieu à l'état liquide, semi-liquide, gélifié, pâteux, solide ou analogue, notamment des produits alimentaires, des produits d'hygiène, des fluides biologiques, en particulier dans le cadre de l'analyse biologique, mettant en oeuvre des structures fluorescentes, dénommées ci-après billes, aptes à fixer un antiligand approprié, ledit procédé étant caractérisé en ce que lesdites billes, lesquelles présentent un diamètre et/ou une densité de fluorochrome et/ou une longueur d'onde d'émission identiques ou différents et sur lesquelles est fixé au moins un antiligand approprié, sont mises en contact avec l'échantillon à analyser, de manière à obtenir des complexes formés de nombreuses billes fluorescentes fixées sur chaque particule à détecter, puis en ce que, dans un deuxième temps, le comptage individuel des particules à détecter ainsi marquées est réalisé à l'aide d'un moyen de détection de fluorescence approprié choisi dans le groupe qui comprend le microscope, les cytomètres en flux, les analyseurs d'image et les systèmes à balayage laser.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'antiligand fixé sur lesdites billes est choisi dans le groupe qui comprend des antigènes, des anticorps, des récepteurs, des lectines, des protéines du type A ou G et des avidines spécifiques des particules à rechercher.

3°) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les anticorps sont choisis dans le groupe qui comprend les anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux, mono ou polyspécifiques anti-levures et/ou anti-bactéries et/ou anti-moisissures et/ou anti-parasites et/ou anti-virus et/ou anti-phage et/ou anti-cellules animales et/ou anti-cellules végétales.

4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les billes fluorescentes ont un diamètre inférieur à celui des particules à détecter.

5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les billes ont un diamètre compris entre 0,05 µm et 5 µm.

6°) Kit ou coffret prêt à l'emploi pour la mise en oeuvre du procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une population de billes fluorescentes sur lesquelles est fixé au moins un antiligand approprié, éventuellement associé à des tampons appropriés.

7°) Kit selon la revendication 6, caractérisé en ce que lorsqu'il comprend plusieurs populations de billes, celles-ci sont utilisées seules ou en mélange.

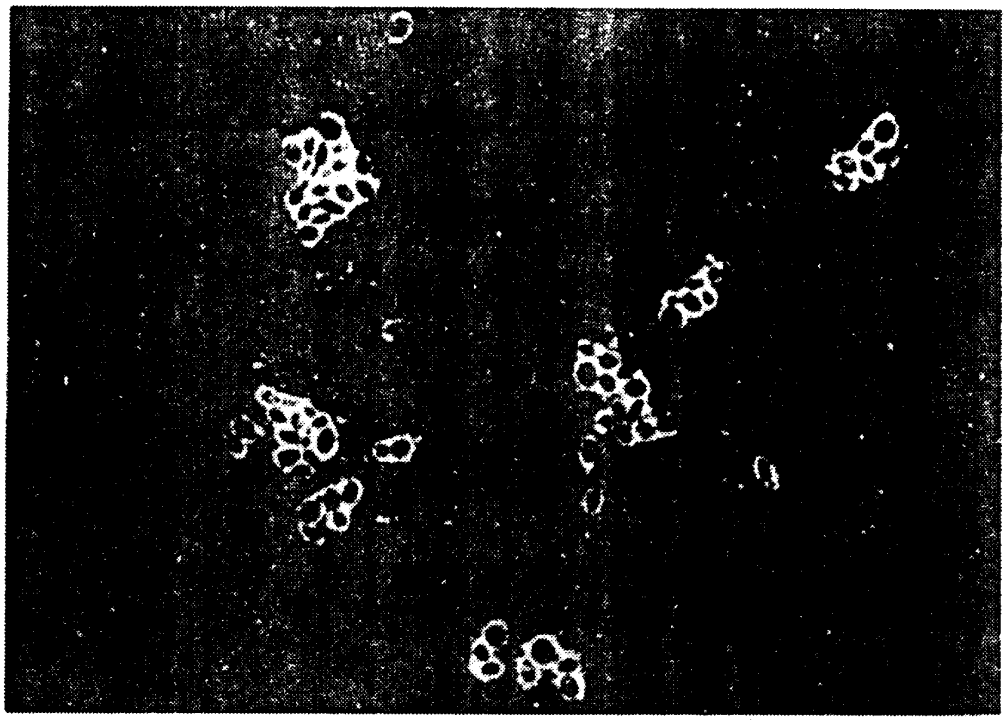

FIG.1

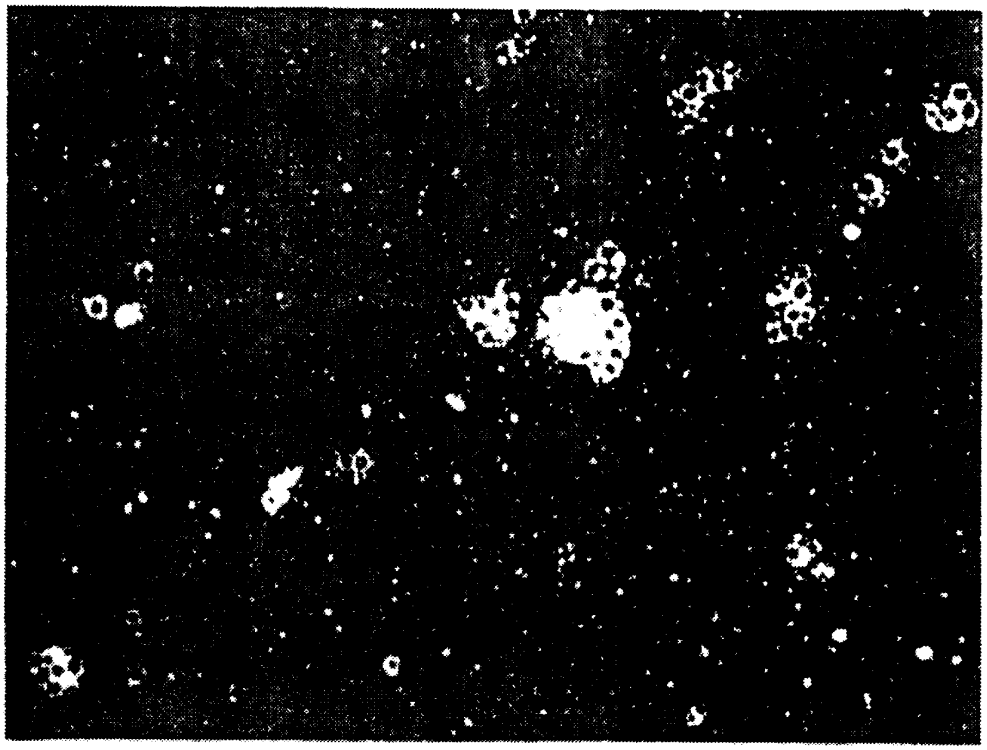

FIG.2