

12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 13.07.07.

30) Priorité :

43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 16.01.09 Bulletin 09/03.

56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71) Demandeur(s) : *RD-BIOTECH Société par actions simplifiée* — FR.

72) Inventeur(s) : DULIEU PHILIPPE.

73) Titulaire(s) :

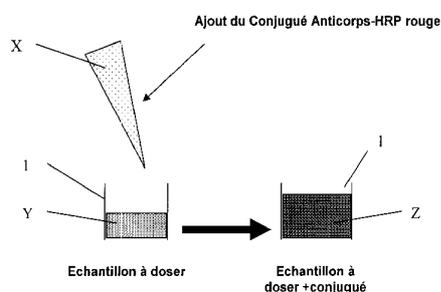
74) Mandataire(s) : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES (CABINET BALLOT).

54) **PROCEDE POUR LA REALISATION DE TESTS BIOLOGIQUES PAR IMMUNODOSAGE ET TROUSSE TECHNIQUE POUR SA MISE EN OEUVRE.**

57) Procédé pour la réalisation de test biologiques, notamment par immunodosage, consistant à déposer dans un flacon de réaction ou puits une solution d'un premier réactif selon un volume prédéterminé, puis une solution d'un second réactif selon un volume prédéterminé, caractérisé en ce que :

- le premier réactif est dilué dans un colorant de couleur choisie (X) de manière à visualiser sa présence dans le puits (1),

- le second réactif est dilué dans un colorant de couleur choisie (Y), mais différente du précédent, de manière à visualiser sa présence dans le puits (1) par mélange des couleurs (X et Y), donnant naissance à une troisième couleur (Z).



FR 2 918 754 - A1



**PROCEDE POUR LA REALISATION DE TESTS BIOLOGIQUES PAR
IMMUNODOSAGE ET TROUSSE TECHNIQUE POUR SA MISE EN ŒUVRE**

La présente invention trouve son application dans le domaine de la biotechnologie, en particulier les
5 immunodosages.

Plus particulièrement, elle concerne un procédé pour la réalisation de tests biologiques, consistant à déposer dans un flacon de réaction ou puits une
10 solution d'un premier réactif selon un volume prédéterminé, puis une solution d'un second réactif selon un volume également prédéterminé.

A titre d'exemple non limitatif, les immunodosages
15 connus de type « ELISA » (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) s'effectuent de la manière suivante.

Au fond d'un puits, on dispose un premier anticorps (macromolécules ou protéines) fixé au fond du puits par
20 électrostatisme.

Ensuite, on procède à la saturation de la surface par dépôt d'une protéine inerte de type serum albumine.

25 Puis on procède au dépôt d'un échantillon biologique, contenant par exemple un virus, sur l'anticorps.

Enfin, on dépose un second anticorps, toujours spécifique du virus recherché, sur lequel est fixée une enzyme, le virus étant ainsi pris en sandwich entre les premier et second anticorps.

5

De cette manière est mise en évidence la première fixation du virus avec le second anticorps, et c'est en mesurant la réaction de l'enzyme que l'on met en évidence une coloration visuelle, s'il y a virus, et pouvant être quantifiée.

10

Ce test bien connu présente certains inconvénients. En effet, l'échantillon biologique est déposé sur le premier anticorps en très petit volume, de l'ordre de quelques microlitres, dans une microplaque contenant un nombre important de puits.

15

L'opérateur doit donc pipeter des solutions en très faibles volumes et les transférer dans les puits d'une plaque de microtitration constituée de 96 ou 384 puits par exemple. Les difficultés essentielles sont la précision du pipetage et la distribution dans les micro-puits, sans erreur volumétrique.

20

Les solutions biologiques sont généralement incolores et il est par conséquent difficile pour l'opérateur de contrôler si la solution a été déposée au bon volume et dans le bon puits.

25

Dans un certain nombre cas, dont le test « ELISA », le protocole indique l'ajout de deux solutions dans le même puits, comme évoqué précédemment. L'opérateur n'a

30

donc pas de moyens pour lui permettre de vérifier que ces réactifs ont été distribués dans le bon puits, et qu'il n'en a pas déposé deux fois dans le même, ou encore qu'il n'en a pas déposé du tout. Par exemple, si
5 l'on dépose dans un premier temps 20 μ l d'une solution d'un réactif, puis 100 μ l d'une seconde solution d'un second réactif, il n'est pas possible de mettre en évidence d'éventuelles erreurs de pipetage, cela n'étant visible ni à l'œil ni à l'aide d'un appareil.

10

Dans le cadre du test « ELISA », ce problème ne concerne bien entendu que le dépôt de l'échantillon biologique et le dépôt du second anticorps, le premier anticorps étant préalablement fixé au fond du puits.

15

La présente invention a pour but de résoudre le problème exposé ci-dessus, et concerne à cet effet, d'une manière générale, un procédé pour la réalisation de test biologiques, notamment par immunodosage,
20 consistant à déposer dans un flacon de réaction ou puits, une solution d'un premier réactif selon un volume prédéterminé, puis une solution d'un second réactif selon un volume prédéterminé, caractérisé en ce que :

25

- le premier réactif est dilué dans un colorant de couleur choisie de manière à visualiser sa présence dans le puits,

30

- le second réactif est dilué dans un colorant de couleur choisie, mais différente du précédent, de manière à visualiser sa présence dans le puits par mélange des couleurs, donnant naissance à une troisième couleur.

L'invention concerne également les caractéristiques qui ressortiront au cours de la description qui va suivre, et qui devront être considérées isolément ou
5 selon toutes leurs combinaisons techniques possibles.

Cette description donnée à titre d'exemple non limitatif, fera mieux comprendre comment l'invention peut être réalisée en référence au dessin annexé sur
10 lequel:

La figure unique représente, schématiquement et à titre d'exemple, le fonctionnement d'un test « ELISA » selon le procédé de l'invention.

15 Le procédé selon l'invention consiste donc dans son principe à colorer de deux couleurs distinctes les solutions utilisées dans le test, de telle manière que, d'une part, le dépôt d'un petit volume de quelques microlitres soit aisément repérable par
20 l'expérimentateur, et que d'autre part, le mélange des deux solutions colorées produise un changement de couleur résultant, couleur qui pourra être caractéristique de la bonne distribution des réactifs.

25 Comme le montre bien la figure,
- le premier réactif est dilué dans un colorant de couleur choisie X de manière à visualiser sa présence dans le puits 1,
- le second réactif est dilué dans un colorant
30 de couleur choisie Y, mais différente du précédent, de manière à visualiser sa présence dans le puits 1 par mélange des couleurs X et

Y, donnant naissance à une troisième couleur Z.

Concernant plus particulièrement le test biologique du type « ELISA », celui-ci consiste à déposer, sur un premier anticorps fixé dans un flacon de réaction ou puits, un échantillon biologique contenant le virus, puis à déposer un second anticorps spécifique du même virus recherché sur lequel est fixée une enzyme.

10

Dans ce cas, le procédé selon l'invention est remarquable par les étapes suivantes :

- l'échantillon biologique est dilué dans un colorant de couleur choisie X,
- 15 - le second anticorps est dilué dans un colorant de couleur choisie Y, mais différente du précédent,
- on dépose dans le puits, sur le premier anticorps, l'échantillon biologique de couleur choisie X, selon un volume prédéterminé,
- 20 - on effectue un contrôle visuel ou spectrophotométrique du dépôt réel de l'échantillon biologique dans l'ensemble des puits 1 du fait de leur coloration volumétrique X,
- 25 - on dépose dans le puits, sur l'échantillon biologique de couleur X, le second anticorps de couleur choisie Y, selon un volume prédéterminé,
- 30 - on effectue un contrôle visuel ou spectrophotométrique du dépôt réel du second anticorps sur l'échantillon biologique dans

les puits, du fait du changement de coloration de l'ensemble par mélange de l'échantillon biologique de couleur X avec le second anticorps de couleur Y, donnant une nouvelle
5 couleur Z.

L'invention concerne également les kits ou troussees d'analyse biologique, plus particulièrement les immuno-essais de type « ELISA » mis en œuvre dans les
10 laboratoires de recherche, ou laboratoires cliniques. Les échantillons biologiques sont souvent disponibles en faible quantité notamment lorsque plusieurs analyses différentes sont requises pour un même échantillon. Afin de les réaliser sur les échantillons dans de
15 meilleures conditions de spécificité, il est souvent nécessaire de diluer ces échantillons. De plus, ces méthodes d'analyses étant très sensibles, il ne faut utiliser que de très faibles quantités d'échantillons pour réaliser les tests.

20 L'invention vise à utiliser une solution colorée pour diluer l'échantillon à analyser et le rendre visible même en très faible volume (quelques microlitres). L'utilisation de solutions en très
25 faibles volumes, distribuées manuellement dans une plaque de microtitration est donc contrôlable visuellement et très simplement.

Dans une trousse de dosage des immunoglobulines
30 humaines, les échantillons contenant sont dilués au $1/100^{\text{ème}}$ dans la solution de dilution, de couleur bleu. 20 μl de la dilution sont déposés dans un puits de

plaque de microtitration. 100 µl de la solution colorée en rouge (contenant les réactifs de détection des IgG (immunoglobulines) humaines), sont ensuite additionnés aux 20 µl de solution bleue, formant une coloration violette de la solution dans le micro-puits. La nuance de violet peut éventuellement être contrôlée en plaçant la microplaque dans un lecteur de microplaque à 492 et 620 nm (nanomètres). A défaut on pourra remarquer visuellement une erreur de volume de solution X comme une erreur sur la solution Y par une différence significative de la couleur Z violette attendue.

A l'issue de la phase d'incubation, les micro-puits sont vidés et lavés éliminant toute coloration. La réaction d'immuno-essai peut se dérouler classiquement comme tout ELISA, à savoir la révélation de l'activité enzymatique, proportionnelle à la quantité d'IgG (immunoglobulines) présentes dans l'échantillon à analyser.

Selon les avantages procurés par l'invention, la coloration de la solution X de dilution de l'échantillon en bleu, permet d'une part de rendre visible le dépôt d'un très faible volume de celui-ci dans le puits de microtitration, ce qui est impossible à contrôler sans cette coloration.

La coloration en rouge de la solution Y contenant le réactif dit conjugué enzymatique permet après mélange d'obtenir une coloration Z violette très nette et prouve que les réactifs ont bien été déposés, qui plus est au bon volume.

A titre d'exemple, nous allons décrire un test où l'expérimentateur doit déposer 20 µl de la solution X (bleue) et 100 µl de la solution Y (rouge).

5 - Si dépôt correct de 1 x 20 µl de la solution X (bleue) dans le puits 1, et 1 x 100 µl de la solution Y (rouge) : le mélange sera de couleur **violet prononcé**.

 - Si dépôt de 2 x 20 µl de la solution X (bleue) dans le puits, et 1 x 100 µl de la solution Y (rouge) :
10 la couleur du mélange sera **bleue**, visible à l'œil, donc erreur visible directement.

 - Si oubli de dépôt de la solution X (bleue) : couleur **rouge**, donc erreur visible directement.

 - Si dépôt de 1x 20 µl de la solution X
15 (bleue), et dépôt de 2 x 100 µl de solution Y (rouge) : mélange d'une couleur **violet pâle**, donc erreur visible directement.

20 Selon l'avantage procuré par l'invention, sans coloration des solutions en présence, les erreurs précitées seraient quasiment indétectables.

25 A noter également que lorsque l'on réalise de nombreux essais simultanément, plusieurs microplaques de 96 puits, après dépôt des échantillons, les plaques peuvent être contrôlées par lecture dans un lecteur de microplaques par spectrophotométrie permettant de plus la détection d'erreurs de pipetage volumétrique.

30 L'invention concerne également une trousse pour la mise en œuvre du procédé qui vient d'être décrit, contenant :

- des puits de microplaques revêtus d'anticorps anti-immunoglobulines humaines, prêts à l'emploi,
- 5 - la solution de diluant pour les échantillons (colorée en bleu),
- une solution rouge contenant le conjugué enzymatique à mélanger avec l'échantillon dilué, pour former une coloration violet,
- 10 - une gamme de contrôles pour permettre de faire le dosage,
- une solution de révélation ou substrat,
- une solution d'arrêt.

La trousse permet de réaliser le test dans son
15 intégralité.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour la réalisation de test biologiques, notamment par immunodosage, consistant à déposer dans un flacon de réaction ou puits une solution d'un premier réactif selon un volume prédéterminé, puis une
5 solution d'un second réactif selon un volume prédéterminé, caractérisé en ce que :

- le premier réactif est dilué dans un colorant de couleur choisie (X) de manière à visualiser sa présence dans le puits (1),
- 10 - le second réactif est dilué dans un colorant de couleur choisie (Y), mais différente du précédent, de manière à visualiser sa présence dans le puits (1) par mélange des couleurs (X et Y), donnant naissance à une troisième
15 couleur (Z).

2. Procédé selon la revendication 1 pour la réalisation de tests biologiques par immunodosage du type « ELISA » consistant à déposer sur un premier
20 anticorps préfixé dans un flacon de réaction ou puits : un échantillon biologique contenant le virus, puis un second anticorps spécifique du même virus recherché, sur lequel est fixé une enzyme, caractérisé en ce que :

- l'échantillon biologique est dilué dans un
25 colorant de couleur choisie (X),
- le second anticorps est dilué dans un colorant de couleur choisie (Y), mais différente du précédent,

- on dépose dans le puits, sur le premier anticorps, l'échantillon biologique de couleur choisie (X), selon un volume prédéterminé,
- 5 - on effectue un contrôle visuel ou spectrophotométrique du dépôt réel de l'échantillon biologique dans l'ensemble des puits (1) du fait de leur coloration volumétrique (X),
- 10 - on dépose dans le puits, sur l'échantillon biologique de couleur (X), le second anticorps de couleur choisie (Y), selon un volume prédéterminé,
- 15 - on effectue un contrôle visuel ou spectrophotométrique du dépôt réel du second anticorps sur l'échantillon biologique dans les puits, du fait du changement de coloration de l'ensemble par mélange de l'échantillon biologique de couleur (X) avec le second anticorps de couleur (Y), donnant une nouvelle
- 20 couleur (Z).

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est dilué dans un colorant de couleur (X) bleue.

25

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le second anticorps est dilué dans un colorant de couleur (Y) rouge.

30 5. Procédé selon les revendications 3 et 4, caractérisé en ce que la couleur (Z), résultat du mélange des couleurs (X et Y) est le violet.

6. Trousse pour la mise en œuvre du procédé selon les revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle contient :

- 5 - des puits de microplaques revêtus d'anticorps anti-immunoglobulines humaines, prêts à l'emploi,
- la solution de diluant pour les échantillons (colorée en bleu),
- 10 - une solution rouge contenant le conjugué enzymatique à mélanger avec l'échantillon dilué, pour former une coloration violet,
- une gamme de contrôles pour permettre de faire le dosage,
- 15 - une solution de révélation ou substrat,
- une solution d'arrêt.

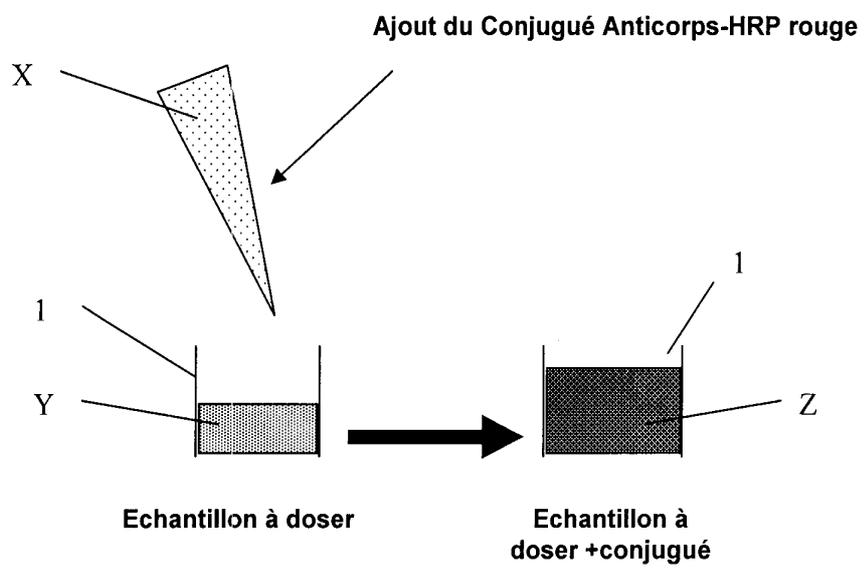


Figure unique



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 696187
FR 0705099

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 3 957 436 A (MURRAY DENNIS M) 18 mai 1976 (1976-05-18)	1	G01N33/52 G01N1/30 B01L3/00
Y	* revendications 1-10; figures 1,2 * * colonne 3, ligne 64 - colonne 5, ligne 56 * * colonne 5, ligne 57 - colonne 6, ligne 54 *	2-6	
Y	----- US 4 639 419 A (OLSON DOUGLAS R [US] ET AL) 27 janvier 1987 (1987-01-27) * revendications 1-46 *	6	
Y	----- MUNRO JAMES ET AL: "Production of polyclonal and monoclonal antibodies against gill-associated virus and the development of an ELISA" AQUACULTURE, vol. 262, no. 2-4, 30 novembre 2006 (2006-11-30), pages 173-182, XP005868549 ISSN: 0044-8486 * figure 1 *	2-6	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			G01N
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		6 mars 2008	Jenn, Thierry
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0705099 FA 696187

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **06-03-2008**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 3957436	A	18-05-1976	AUCUN	

US 4639419	A	27-01-1987	AUCUN	
