

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 587 120

②1 N° d'enregistrement national :

86 12551

⑤1 Int Cl⁴ : G 01 N 21/64, 21/76, 33/533; G 02 B 27/56,
6/02.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 8 septembre 1986.

③0 Priorité : US, 9 septembre 1985, n° 773 940.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 11 du 13 mars 1987.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *ORD, Inc. (société de droit américain).*
— US.

⑦2 Inventeur(s) : Myron J. Block et Tomas B. Hirschfeld.

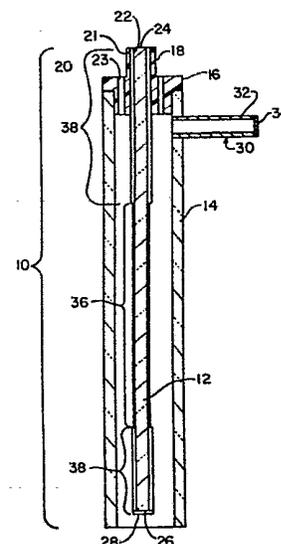
⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Malémont.

⑤4 Procédé et appareil pour analyser un échantillon de fluide.

⑤7 Ce procédé d'analyse impliquant la mesure d'une fluores-
cence déclenchée dans un échantillon de fluide par une onde
évanescence au niveau d'un élément de surface 36 d'un sub-
strat 12 en forme de fibre réalisant une réflexion interne totale
consiste à déclencher la fluorescence dans ledit échantillon
tout en le faisant circuler dans un espace enserré entre une
enceinte 14 possédant des dimensions fixes et délimitée en
partie par ledit élément de surface, un volume suffisant de
l'échantillon étant prévu afin de maintenir l'enceinte remplie
alors que l'échantillon circule.

Application notamment aux appareils d'analyse immunolo-
gique.



FR 2 587 120 - A1

D

Procédé et appareil pour analyser un échantillon de fluide

La présente invention concerne l'analyse immuno-
logique et plus particulièrement l'analyse immunologique
basée sur la fluorescence et selon laquelle l'onde évanes-
5 cente produite par une réflexion totale interne est utili-
sée pour limiter le volume observé à une lamelle, ce qui
permet d'éviter une phase opératoire de séparation ou de la-
vage, tout en réduisant également les effets de substances
de fond perturbatrices ne réagissant pas du point de vue
10 immunologique et qui sont présentes dans l'échantillon.

L'utilisation de techniques de réflexion totale
interne en vue de réduire les effets de substances non
réactives du point de vue immunologique lors d'analyses
immunologiques a fait l'objet d'un certain nombre de recher-
15 ches. Par exemple dans le brevet US N° 3 939 350, l'onde
évanescence produite par la réflexion totale interne au
niveau de l'interface entre un substrat fournissant une
réflexion totale interne, comme par exemple une plaque, et
l'échantillon est utilisée pour provoquer la fluorescence
20 dans une partie marquée d'une manière fluorescente de l'é-
chantillon lié de façon immunologique à la plaque, la par-
tie de l'échantillon située au-delà de la zone d'évanes-
cence n'étant pas excitée. De cette manière, on peut réa-
liser une analyse sans qu'il soit nécessaire de retirer
25 l'échantillon n'ayant pas réagi et le réactif. En réalité
l'onde évanescente agit à la manière d'un mécanisme de sé-
paration.

Comme cela est indiqué dans la demande de bre-
vet US N° 406 324 déposée en date du 9 Août 1982 et attri-
30 buée au détenteur de la présente demande, on peut obtenir un
rendement optique supérieur en observant la fluorescence,
déclenchée par l'onde évanescente, qui pénètre en retour
(retourne par effet de tunnel) dans le milieu plus dense du
point de vue optique et se propage dans ce dernier sous
35 l'effet d'une réflexion totale interne. Un appareil perfec-

tionné de ce type et le procédé correspondant d'analyse immunologique sont indiqués dans le brevet US N° 4 447 546, dans lequel il est indiqué qu'à la fois la quantité de l'échantillon et la fin de la réaction peuvent être commandées de façon automatique, en entourant une zone contrôlée de l'élément activé du point de vue immunologique et fournissant une réflexion totale (par exemple une longueur connue d'une fibre optique de diamètre connu) avec un tube capillaire possédant des dimensions connues. De cette manière on peut réaliser des analyses non balistiques rapides, simples et précises.

La durée de la mesure nécessaire pour l'incubation dans l'appareil à fibre entourée par un capillaire est proportionnelle au carré de la distance moyenne de diffusion. Cette dernière correspond approximativement à la distance entre la fibre et la paroi du capillaire. En réduisant cette distance, on peut réduire fortement l'intervalle de temps requis pour que la réaction se termine et on peut par conséquent améliorer fortement la vitesse de l'analyse non balistique. Cependant une telle réduction entraîne également une réduction du volume échantillonné et par conséquent le signal total obtenu par unité de longueur de la fibre, ce qui affecte de façon nuisible la sensibilité. Une telle perte de sensibilité ne peut être partiellement regagnée qu'en augmentant la longueur de la fibre, en raison de l'atténuation du signal dans une fibre sans gaine, comme cela est requis par la présente invention.

C'est pourquoi un but de la présente invention est de fournir un appareil et un procédé permettant de réaliser une analyse immunologique plus rapide basée sur la fluorescence et utilisant une fibre enveloppée, et avec lesquels la sensibilité de l'analyse n'est pas affectée de façon nuisible par la vitesse accrue.

Un autre but de la présente invention est de fournir un appareil et un procédé permettant de réaliser

une analyse immunologique de sensibilité accrue, basée sur la fluorescence.

Ces objectifs ainsi que d'autres objectifs sont atteints conformément à la présente invention au moyen d'une analyse immunologique utilisant une réflexion totale interne et basée sur la fluorescence et lors de laquelle l'échantillon est amené à circuler sur la longueur d'un substrat réalisant une réflexion totale interne et possédant un élément de surface actif entouré par et distant d'une enceinte de manière à former un volume fixe, le débit de l'échantillon étant réglé de manière que le temps de séjour de l'échantillon en vis-à-vis de l'élément de surface actif soit analogue à l'intervalle de temps nécessaire pour évacuer le volume entre le substrat et l'enceinte. Dans une forme de réalisation préférée, le substrat est une fibre optique et l'enceinte est un tube dimensionné et disposé de telle sorte que la distance entre la paroi interne du tube et la surface de la fibre ait la dimension d'un capillaire.

Avec cette structure on peut échantillonner un volume d'échantillons relativement important en un bref intervalle de temps, mais avec à tout moment, l'éclairement d'une faible partie de l'échantillon par l'onde évanescente. La liaison avec la partie activée de la fibre est cumulative, en fonction du titre de l'élément inconnu dans l'échantillon, et du volume évacué.

D'autres buts de l'invention apparaîtront en partie d'une manière évidente et ressortiront en partie ci-après. De façon correspondante, l'invention porte sur un appareil possédant la constitution, la combinaison d'éléments et l'agencement de pièces, et un procédé comprenant les différentes phases opératoires et la relation d'une ou de plusieurs telles phases opératoires en rapport les unes avec les autres, qui sont indiqués à titre d'exemple dans la description détaillée qui va suivre.

D'autres caractéristiques et avantages de la pré-

sente invention ressortiront de la description donnée ci-après en référence aux dessins annexés, sur lesquels :

la figure 1 est une représentation schématique de l'appareil conforme à l'invention tel qu'il est raccordé à un appareil connu pour l'objectif conforme à la présente invention ;

la figure 2 est une vue en coupe transversale longitudinale d'un kit d'analyse immunologique, qui constitue une forme de réalisation préférée d'une partie de l'appareil de la présente invention ; et

la figure 3 est une vue schématique d'une partie de l'appareil de la figure 2, illustrant une réaction immuno-chimique typique, conformément à la mise en oeuvre de la présente invention.

Sur les figures, les chiffres de référence identiques se rapportent à des éléments identiques. On notera également que la représentation sur les figures est schématique et que l'on n'a pas recherché à indiquer des échelles ou rapports réels.

Du point de vue de la terminologie, on notera que dans la description détaillée de l'appareil conforme à la présente invention, les parties de l'appareil sont désignées comme étant des parties "supérieures et inférieures". Ces termes sont utilisés entièrement à titre de commodité et pour associer la description aux représentations schématiques des dessins. On notera que l'appareil peut fonctionner dans n'importe quelle position ou dans n'importe quelle orientation, ceci entrant dans le cadre de la présente invention.

La présente invention fonctionne sur la base d'une fluorescence à réflexion totale en association avec un guidage en tunnel du rayonnement, comme cela est décrit dans la demande de brevet US N° 406 324 déposée le 9 Août 1982 et attribuée au détenteur de la présente demande et qui est incorporée ici en référence en ce

qui concerne des détails complémentaires concernant notamment le mode optique de fonctionnement de l'appareil.

La figure 1 représente un appareil indiqué à titre d'exemple et utile pour la mise en oeuvre de la présente invention, lequel appareil comprend un kit 6, un fluorimètre 7, une seringue 8, une pompe 9 de seringue et un conteneur 10.

En se référant à la figure 2, on peut voir une vue en coupe transversale longitudinale d'un kit d'analyse immunologique d'analyse 6, réalisé conformément aux principes de la présente invention. Le kit 6 comporte une fibre optique 12, un tube capillaire 14 et un bouchon 16.

La fibre 12 est un corps allongé, optiquement transparent et essentiellement cylindrique, permettant la propagation, sur sa longueur et moyennant des réflexions totales internes multiples, d'un rayonnement optique pénétrant par une extrémité de la fibre, sous un angle solide déterminé, présentant essentiellement une symétrie de révolution autour de l'axe de la fibre. Comme cela est bien connu dans la technique des fibres optiques, l'angle d'incidence maximum, par rapport à l'axe B de la fibre, pour le rayonnement pénétrant dans la fibre et se propageant à l'intérieur de cette dernière est réglé au moyen des indices de réfraction de la fibre et du milieu environnant. Pour un rayonnement se propageant initialement à travers un milieu possédant un indice de réfraction n_0 et tombant sur une fibre possédant un indice de réfraction n_1 et entourée par ailleurs par un matériau possédant un indice de réfraction n_2 , l'angle d'incidence maximum peut être déterminé à partir de la relation

$$(1) \quad \text{N.A.} = n_0 \sin B = (n_1^2 - n_2^2)^{1/2}$$

dans laquelle N.A. est ce qu'on appelle l'ouverture numérique de la fibre. A titre d'exemple, sans aucun caractère limitatif, la fibre 12 peut être constituée par un matériau faisant partie d'un certain nombre de matériaux transparents

du point de vue optique, comme par exemple le verre, le quartz, le polypropylène, une polyoléfine, le produit connu dans le commerce sous la marque Nylon ou analogue, choisi de manière à posséder un indice de réfraction supérieur à ce-
5 lui de l'échantillon de fluide que l'on analyse. De façon typique ce dernier est une solution aqueuse possédant un indice de réfraction proche de 1,33 ou un échantillon de sérum possédant un indice de réfraction proche de 1,35. On choisit en outre pour la fibre un matériau qui est relati-
10 vement insoluble dans l'échantillon de fluide et ne réagit pas avec ce dernier. Il s'est avéré qu'un diamètre de 200 microns est satisfaisant pour la fibre, bien que l'on puisse utiliser d'autres diamètres de la fibre. Pour la plupart des analyses, une fibre d'une longueur de 25 mm s'avère appro-
15 pirée ; cependant on comprendra que la longueur de la fibre peut être adaptée à l'analyse devant être effectuée. En fait la sensibilité augmente lorsque la longueur de la fibre augmente, jusqu'à ce que l'atténuation du signal sur la longueur de la fibre dépasse $1/e$.

20 Comme cela sera décrit de façon détaillée ci-après, la fibre 12 est munie d'un revêtement superficiel comprenant des moyens pour fixer des fragments sélectionnés d'un complexe antigène-anticorps. Tel qu'il est utilisé ici le terme "complexe antigène-anticorps" inclut des complexes
25 non seulement d'anticorps et d'antigènes complets, mais des complexes comprenant des fragments, réactifs du point de vue immunologique de l'un ou l'autre de ces éléments ou de ces deux éléments.

Le tube capillaire 14 est de préférence un tube
30 transparent du point de vue optique, le matériau qui le constitue étant également choisi de manière à être relativement insoluble dans l'échantillon de fluide qui est analysé et non réactif avec ce dernier. C'est pourquoi le tube capillaire 14 est constitué de préférence avec des matériaux
35 tels que le verre, le quartz, le polypropylène, une polyolé-

fine ou analogue.

Dans une forme de réalisation préférée, le tube capillaire est un perçage en forme de cylindre circulaire droit, possédant un diamètre intérieur légèrement supérieur 5 au diamètre de la fibre 12 (par exemple pour une fibre d'un diamètre de 200 microns, le tube capillaire 14 peut posséder un diamètre intérieur égal à environ 240 microns). Cependant, comme cela sera décrit, l'invention peut être mise en oeuvre en utilisant des tubes capillaires possédant un 10 diamètre inférieur nettement supérieur à celui de la fibre.

Le bouchon 16 est conformé et dimensionné de manière à s'adapter dans une extrémité du tube capillaire 14 et supporte une partie d'extrémité 18 de la fibre 12, de sorte qu'elle est essentiellement coaxiale par rapport au tube capil- 15 laire 12, tout en étant distant de ce dernier. En outre le bouchon 16 comporte une surface dure de positionnement utilisée pour positionner le kit 6 dans un fluorimètre, comme cela sera décrit ci-après. A cet effet le bouchon 16 est muni de préférence d'une bride 20 possédant un diamètre hors- 20 tout égal approximativement au diamètre extérieur du tube capillaire 14 et un prolongement central 21 en forme de manchon, coaxial du perçage central 22. Le perçage 22 pénètre dans le bouchon 16 et est dimensionné de manière à fixer la partie d'extrémité 18 de la fibre 12. Dans une 25 forme de réalisation préférée, le bouchon 16 est moulé en place autour de la fibre 12, ledit bouchon étant de préférence réalisé en un matériau possédant un faible indice de réfraction, comme par exemple du siloxane. La fibre 12 traverse le bouchon 16 et est supportée par ce dernier de ma- 30 nière à exposer essentiellement l'ensemble de la fibre, hormis la partie d'extrémité 18, à l'intérieur du tube capillaire 14, en laissant la face d'extrémité 24 de la partie d'extrémité 18 non masquée et située de niveau avec l'extrémité du perçage 22 à l'extérieur du tube capillaire.

35 La face d'extrémité 24 est de préférence plane

et perpendiculaire à l'axe de la fibre 12. De préférence la face d'extrémité 24 est également extrêmement transparente et exempte de défauts tendant à diffuser la lumière tombant sur la face d'extrémité. A cet effet la face d'extrémité 24 peut être polie optiquement, bien qu'il se soit avéré que l'on peut cliver une fibre de quartz fondue pour former une surface optique appropriée.

D'une manière optionnelle, la face d'extrémité 26 de la partie de la fibre éloignée de la face d'extrémité 24 comporte également un poli plat ou est clivée et est en outre munie d'un revêtement réfléchissant 28 (ou un miroir séparé) disposé essentiellement perpendiculairement à l'axe de la fibre, ce qui a pour effet que le rayonnement piégé dans la fibre circule deux fois dans cette dernière.

On choisit les dimensions hors-tout de la fibre 12, du tube capillaire 14 et du bouchon 16 de préférence de manière à garantir que la face d'extrémité 26 de la fibre se situe à l'intérieur du tube capillaire.

On notera que le kit 10, tel qu'il est décrit, est essentiellement le même que celui indiqué dans le brevet US N° 4 447 546. Ce qui est important cependant dans la présente invention, c'est que le tube 14 est muni d'un orifice 30 qui est en communication fluidique avec l'intérieur du tube 14, distant de l'extrémité ouverte du tube. Dans une forme de réalisation préférée, l'orifice 30 se présente sous la forme d'un conduit tubulaire 32 muni d'une cloison 34. Le conduit tubulaire 32 est situé à proximité du bouchon 16 et s'étend radialement à partir du tube 14. Comme cela est bien connu dans la technique, la cloison 34 est apte à être pénétrée par une seringue hypodermique (non représentée), et l'intérieur du conduit 32 est dimensionné de manière à recevoir l'aiguille destinée à être utilisée avec le système. On comprendra que l'orifice 30 peut être tout aussi bien l'organe d'accouplement approprié pour la fixation à une seringue équipée d'un système de verrouillage Luer ou

un appareil équivalent.

Avant son montage dans le kit 10, on appose sur la fibre 12 un revêtement qui active, comme cela sera décrit une zone 36 de la surface cylindrique de la fibre pour l'analyse devant être effectuée. Dans une forme de réalisation préférée, la zone activée 36 est limitée à une longueur prédéterminée de la fibre 12 au moyen d'un revêtement 38 inerte du point de vue chimique et optique et constitué par exemple par du silicone possédant un faible indice de réfraction et s'étendant sur les deux extrémités de la fibre. Mais on comprendra que les dimensions de la zone activée 36 peuvent être réglées à l'aide d'autres moyens, (par exemple par masquage de la fibre pendant l'opération de revêtement) ou, sinon, on peut activer toute la longueur de la fibre 12 et on peut régler soigneusement la longueur de la fibre disposée à l'intérieur du tube capillaire.

En se référant maintenant à la figure 3, on peut y voir une représentation extrêmement schématique d'une partie d'une coupe transversale longitudinale du kit 2 dans la zone activée 36 de la fibre 12, remplie par un échantillon 43 devant être analysé. La surface de la fibre 12 dans la zone 34 est munie d'une pluralité de sites 44 de couplage, à un certain nombre desquels se trouve liée un fragment 46 du complexe anticorps-antigène. Telle qu'elle est utilisée ici, l'expression "fragment d'un complexe anticorps-antigène" se réfère à une partie, réactive du point de vue immunologique, d'un tel complexe et inclut des haptènes ainsi que des antigènes complets et des fragments d'anticorps réactifs à l'égard des antigènes [Fab] ainsi que des anticorps complets. Les sites de couplage 44 sont choisis de manière à immobilise des moitié 46 sans affecter de façon notable la réactivité (par exemple l'affinité et l'avidité) du fragment correspondant à la partie complémentaire du complexe. Dans une forme de réalisation préférée, la fibre 12 est en verre ou en quartz, les sites de couplage 44 sont des groupes réac-

tifs d'un composé silyle tel que du 3-aminopropyltriméthoxysilane, et les fragments 46 sont formés par un anticorps tel que l'immunoglobuline G (IgG). Cette combinaison particulière d'une phase solide, d'un site de couplage 44 et d'un fragment 46 peut être lié par les terminaisons carboxyle de l'anticorps, ce qui laisse libres les terminaisons amino, réactives à l'égard de l'antigène de l'anticorps.

Les procédés de préparation de la surface du verre de la fibre 12 ou de fixation du composé silyle à cette dernière et de la liaison covalente d'un anticorps au verre au moyen du couplage avec le composé silyle sont décrits par Weetall (brevet US N° 3 652 761) dans lequel on peut également trouver une description d'autres composés silyle et les procédés à l'aide desquels on peut lier de manière covalente les groupes carboxyle, amino et d'autres groupes réactifs d'un anticorps ou d'un antigène (ou de leurs fragments)

à différentes substances minérales. Il faut noter qu'il existe également une technique répandue pour immobiliser des antigènes ou des anticorps sur des polymères, et les spécialistes de la technique comprendront que les sites de couplage 44 pour l'antigène ou l'anticorps peuvent être également ménagés sur des fibres polymères. C'est pourquoi par exemple si la fibre 12 est réalisée au moyen du produit désigné sous l'appellation Nylon (polyamide) le couplage peut prendre la forme de la substitution d'un radical approprié, à l'hydrogène lié aux groupes amino du polymère. On notera que les sites de couplage 44 peuvent également comporter des groupes séparateurs, comme cela est bien connu dans la technique, pour garantir une séparation suffisante entre la fibre 12 et les fragments 46 afin de réduire au minimum l'empêchement stérique du processus de liaison anticorps-antigène. Par exemple les sites de couplage 44 peuvent comporter une chaîne de polyéthylène comme par exemple dans le cas du 1,6-diaminohexane ou de l'acide 6-aminohexanoïque lié à la fibre 12 par l'intermé-

diaire d'une liaison peptidique et fournissant respectivement un groupe amino primaire libre et un groupe carboxyle libre pour une liaison covalente avec la terminaison carboxyle ou la terminaison amino d'un fragment 46 de protéines. L'un ou 5 l'autre de ces matériaux de couplage fournit une chaîne à 6 atomes de carbone entre les terminaisons, ce qui sépare le fragment 46 de la fibre 12 par une distance correspondante. Un couplage approprié similaire et des matériaux de séparation similaires sont bien connus dans les techniques à la 10 fois de l'analyse immunologique et de la chromatographie d'affinité .

Dans une forme de réalisation préférée, la fibre 12 est munie d'une moitié 46 dont certains sites de liaison sont occupés, comme cela est repéré par des références indicées 46C, les fragments étant en partie munis du 15 complément marqué et associé 50 pour les analyses immunologiques compétitives. C'est pourquoi, dans une forme de réalisation, le fragment 46 est un anticorps et une précharge formée de l'antigène ou du haptène marqué est incorporée dans le 20 revêtement de la fibre 12. Chacun des composants marqués 50 est muni d'une quantité prédéterminée d'un fluorogène 52, ce qui fournit une marque. Le composé fluorescent particulier, qui est intéressant pour le marquage, inclut la fluorescéine, la tétraméthylrhodamine, des chélates des 25 terres rares et analogues. Les procédés permettant de fixer des marques fluorescentes à des protéines sont bien connus dans la technique et bon nombre des composés fluorescents disponibles dans le commerce possèdent des groupes permettant la fixation à des protéines. De préférence, pour l'ana- 30 lyse concurrente une partie fixe des sites de couplage 44 sont munies d'une protéine 56 inerte du point de vue immunologique, comme par exemple l'albumine. Le revêtement peut être agencé de manière à posséder une composition superficielle fixée grâce à l'utilisation de phénomènes d'absorp- 35 tion, comme indiqué ci-après.

Pour une solution d'enduction préparée avec une concentration appropriée des réactifs, la simple immersion d'une fibre activée avec des groupes 44 de liaison superficiels corrects fournit une couche superficielle unique formée d'une protéine liée chimiquement. La proportion de l'immunoglobuline par rapport à la protéine inerte dans cette couche est fournie (mais n'y est pas identique) par leur proportion dans la solution. Tout remplissage partiel des sites actifs pour l'immunoglobuline avec un antigène marqué sera naturellement maintenu au niveau présent dans la solution. Après immersion, on retire la fibre de la solution d'enduction. Afin d'empêcher que la couche de liquide, qui adhère à la fibre, n'entraîne une quantité supplémentaire de réactif, on lave rapidement la fibre avant qu'une évaporation supplémentaire puisse se produire. La couche de protéine, qui est liée de façon covalente, n'est pas éliminée lors de cette opération. Afin d'empêcher la liaison de plus d'une couche de protéine, le réactif à double fonction ne doit pas modifier la charge totale de la protéine (ceci peut être fixé au moyen d'un réglage du pH de la solution d'enduction) et ne doit pas présenter une distance de séparation trop grande.

Le kit 6 est destiné à être utilisé avec un fluorimètre 7 (figure 4) qui est choisi de manière à exciter la fluorescence et la recevoir en provenance du composant marqué du réactif. Un fluorimètre approprié est décrit dans le brevet US N° 4 447 546 mentionné précédemment, dans lequel on peut également trouver une description de son fonctionnement. Ce qui est important, comme cela est décrit dans ce brevet, le fluorimètre lit de préférence l'émission fluorescente se propageant en retour en direction de l'extrémité de la fibre, au niveau de laquelle le rayonnement d'excitation a été introduit.

Le guide 6 conforme à la présente invention est utilisé également dans l'une ou l'autre des demandes de

brevet mentionnées précédemment. Cependant, et cela est important, dans la présente invention, le volume de l'échantillon utilisé lors d'une détermination n'est pas nécessairement limité au volume correspondant à l'espace 5 situé entre la fibre 12 et le tube 14.

En cours d'utilisation, la forme de réalisation préférée de l'appareil conforme à l'invention requiert tout d'abord que l'on prélève un échantillon au moyen de la seringue 8 que l'on raccorde alors comme dans le cas du dispositif de verrouillage Luer, au kit 10 comme indiqué sur la figure 1, c'est-à-dire que l'on place la seringue 8 dans la pompe à seringue 9 et qu'on raccorde le kit 6 au fluorimètre 7. On active alors la pompe à seringue 9 en repoussant l'échantillon dans la seringue 8 à travers le kit 6 conformément à un certain débit, comme cela va être décrit. La pompe 9 constitue par conséquent des moyens de réglage du débit de sorte que le temps de séjour de l'échantillon 43 à l'opposé de la zone activée 46 est analogue à la durée requise pour vider complètement le volume présent entre la fibre 12 et le tube 14. Le débit plus rapide entraîne un accroissement de la sensibilité du système mais tend à réduire le rendement d'utilisation de l'échantillon en raison d'un refoulement incomplet. L'écoulement de l'échantillon dans l'espace intercalaire compris entre la fibre 25 12 et le tube 14 doit remplir complètement cet espace et doit le remplir de préférence pendant l'ensemble de l'analyse. Comme cela est indiqué dans le brevet US N° 4 447 546 le fluorimètre 7 est conformé de manière à éclairer la face d'extrémité 24 de la fibre 12 dans les limites de l'angle 30 conique défini par l'ouverture numérique de la fibre. Ce rayonnement se propage par conséquent à l'intérieur de la fibre 12 avec l'angle critique ou au-dessus de cet angle (comme indiqué par le rayon 54 sur la figure 3) et subit des réflexions internes totales multiples sur l'étendue en longueur de la fibre. Il en résulte qu'une onde évanescente 35

est produite dans le fluide 43 au voisinage de la fibre pendant l'écoulement de l'échantillon le long de la zone activée 36.

Une liaison concurrentielle des composants 5 marqués 50 et des composants non marqués 54 à des fragments 46 fixés à la fibre aboutit à la formation de complexes 46C marqués de façon fluorescente, proportionnelle à la concentration relative des composants marqués par rapport aux composants non marqués. Les complexes marqués 46C, 10 qui sont excités par l'onde évanescence, émettent une fluorescence. Une partie de l'émission fluorescente pénètre selon un mode en tunnel dans la fibre en se propageant à l'intérieur de cette dernière le long de trajets dépassant l'angle critique, comme indiqué par exemple par le rayon 15 56 sur la figure 3. Une moitié ou plus de cette émission de fluorescence soumise à une réflexion totale sort de la fibre au niveau de la face d'extrémité 24 où elle est collectée par le fluorimètre 7.

Si l'espace intercalaire entre la fibre et le 20 tube est rempli complètement par le fluide de l'échantillon, au moins au voisinage de la zone activée 36, le volume de l'échantillon qui est à l'instant considéré, en face de la zone active 34 de la fibre est fourni par :

$$(2) \quad V = L \pi (D^2 - d^2)/4$$

25 où L est la longueur de la zone active 36 de la fibre 12, D est le diamètre intérieur du capillaire et d est le diamètre de la fibre. Le volume observé est fourni par une relation similaire, la quantité (D-d) étant remplacée par l'épaisseur effective de la zone observée. La durée 30 d'incubation, nécessaire pour évacuer le volume statique tel que fournit par la relation (2) est :

$$(3) \quad t = k [(D - d)/(2s)]^2$$

où k est une constante de réaction chimique sans dimensions (qui dépend par exemple de la densité des sites de liaison 35 sur la fibre, de la probabilité qu'une espèce réactive dans

l'échantillon rencontre un site de liaison, etc) et s est le déplacement brownien. Si D et d sont exprimés en cm et s en $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1/2}$, alors t est exprimé en secondes. La valeur de k est comprise entre environ 1 et 10 pour tous les buts d'utilisation pratique.

Si l'échantillon peut circuler le long de la zone active de manière à se déplacer sur la longueur de la zone active pendant un intervalle de temps égal à la durée d'incubation statique, alors, à partir de la relation (3), on obtient :

$$(4) \quad v = L/t = 4Ls^2/k(D - d)^2$$

où v est la vitesse d'écoulement.

En combinant les relations (2) et (3), on trouve que le volume évacué par unité de temps d'incubation, V/t , est :

$$(5) \quad V/t = \pi L s^2 (D + d)/k (D - d)$$

La relation 5 définit le volume d'écoulement réel efficace d'échantillons par une unité de temps. Un débit plus important ne permet pas une évacuation complète de l'échantillon, tandis qu'un débit volumique plus faible a pour effet que l'échantillon est situé en vis-à-vis de la zone active pendant un intervalle de temps plus long que le temps nécessaire.

On peut voir, à partir de la relation (5), que la valeur de V/t peut être rendue maximale grâce à un accroissement de la longueur de la zone active et grâce à un réglage approprié de la différence entre D et d , rendant cette différence aussi faible que possible. Cependant il faut noter qu'il n'est pas nécessaire de limiter physiquement le diamètre du capillaire. Le volume entraîné par un diamètre supérieur ne sera pas échantillonné, mais la perte d'une partie de l'échantillon est habituellement admissible et il est préférable de construire l'appareil avec des exigences de tolérances extrêmement petites.

On peut utiliser un volume capillaire important

avec une vitesse d'écoulement de l'échantillon supérieure à celle fournie par la relation (4) de manière à obtenir un diamètre efficace du capillaire, D_{eff} , fourni par

$$(6) \quad D_{\text{eff}} = d + s (L/kv)^{1/2}$$

- 5 Dans un tel agencement, k est plus faible et par conséquent le rapport optimal du volume au temps V/t sera supérieur en raison de l'évacuation de l'échantillon en dehors de l'espace de diamètre efficace D_{eff} ainsi qu'en raison de l'absence de toute nécessité d'attendre l'évacuation complète
- 10 de l'échantillon.

A titre d'exemple, pour $D = 4d$, on a $a = (D + d) / (D - d) = 1,66$ tandis que pour $D = 1,1d$, on a $(D + d) / (D - d) = 21$. Ce dernier cas fournit une amélioration correspondant à un facteur de 12,6.

- 15 On comprendra également que la fibre 12 et le tube 14 pourraient avoir une forme autre que celle d'un cylindre circulaire droit et que par exemple ces éléments pourraient être constitués par un couple de plaques parallèles enserrant entre elles un espace capillaire.

- 20 Etant donné que ces modifications et certaines autres modifications peuvent être apportées à l'appareil et au procédé indiqués précédemment sans sortir du cadre de l'invention, il ressort que l'ensemble des indications contenues dans la présente description ou représentées sur les
- 25 dessins annexés doivent être interprétées comme étant de nature illustrative et non dans un sens limitatif.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour effectuer des analyses impliquant la mesure d'une fluorescence excitée dans un échantillon de fluide par une onde évanescente au niveau d'un élément
5 de surface (36) d'un substrat (12) réalisant des réflexions internes totales, caractérisé en ce qu'il consiste à déclencher ladite fluorescence dans ledit échantillon en faisant circuler ce dernier dans une enceinte (14) possédant des dimensions fixes et délimitées en partie par ledit élé-
10 ment de surface, un volume suffisant dudit échantillon étant prévu pour maintenir ladite enceinte remplie par l'échantillon en circulation.

2. Procédé selon la revendication 1, selon lequel ledit élément de surface (36) est recouvert par un revête-
15 ment (38) comportant une pluralité de sites, en chacun desquels il est possible de fixer un fragment sélectionné d'un complexe chimique, apte à fournir une fluorescence lorsqu'il est excité par ladite onde évanescente, caractérisé en ce qu'il inclut la phase opératoire consistant à mainte-
20 nir la vitesse (v) d'écoulement dudit volume de l'échantillon au moins à la valeur L/t , L étant la longueur dudit élément de surface, mesurée suivant la direction de l'écoulement dudit échantillon au niveau de cet élément de surface et t étant l'intervalle de temps requis pour que ledit
25 revêtement évacue un volume statique dudit échantillon remplissant ladite enceinte.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'au moins une dimension minimale en coupe transversale de ladite enceinte (14) correspond à celle d'un capil-
30 laire, en rapport avec ledit échantillon de fluide.

4. Appareil pour analyser un échantillon de fluide, du type comportant un substrat (12) fournissant une réflexion totale interne et apte à transmettre un rayonne-
ment apte à déclencher une fluorescence dans un matériau
35 fluorescent disposé au moins sur un élément de surface (36)

dudit substrat, qui est également apte à transmettre ladite fluorescence, et des moyens (14) espacés au moins dudit élément de surface dudit substrat de manière à définir une enceinte délimitée en partie par ledit élément de surface, 5 caractérisé en ce qu'il comporte des moyens (9) pour faire circuler d'une manière essentiellement continue ledit échantillon sur au moins ledit élément de surface et en un volume suffisant pour remplir ladite enceinte, tout en déclenchant ladite fluorescence.

10 5. Appareil selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit substrat (12) est une fibre optique.

6. Appareil selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite enceinte (14) est un tube disposé coaxialement par rapport à ladite fibre et l'entourant tout en en 15 étant espacé.

7. Appareil selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'espace intercalaire entre ledit tube (14) et la fibre (12) possède les dimensions d'un capillaire.

8. Appareil selon la revendication 4, caractérisé 20 en ce qu'il comporte un fluorimètre (7) installé de manière à mesurer la fluorescence déclenchée par ladite onde évanescente.

9. Appareil selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comporte des moyens (9) pour régler au moins la 25 vitesse d'écoulement dudit échantillon.

10. Appareil selon la revendication 9, caractérisé en ce que lesdits moyens (9) servant à commander ladite vitesse d'écoulement comprennent des moyens de pompage du fluide.

30 11. Appareil selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit élément de surface (36) est recouvert par un revêtement possédant une pluralité de sites à chacun desquels peut être fixée un fragment sélectionné d'un complexe chimique apte à fournir une fluorescence lorsqu'il est excité par 35 ledit rayonnement, et que lesdits moyens permettant de régler

ladite vitesse d'écoulement règlent une vitesse (v)
d'écoulement dudit volume essentiellement à la valeur

L/t , L étant la longueur, mesurée suivant la direction
d'écoulement dudit échantillon, dudit élément de surface
5 (36) et t étant l'intervalle de temps requis par ledit
revêtement pour évacuer un volume statique dudit échantil-
lon remplissant ladite enceinte (14).

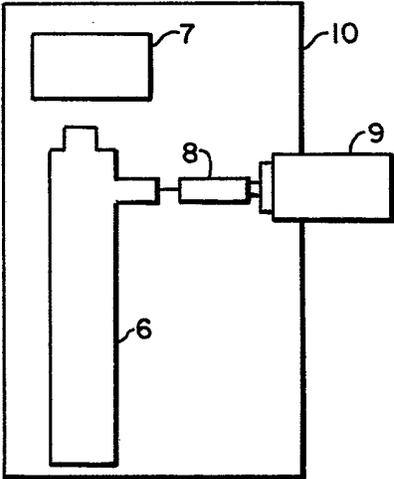


FIG. 1

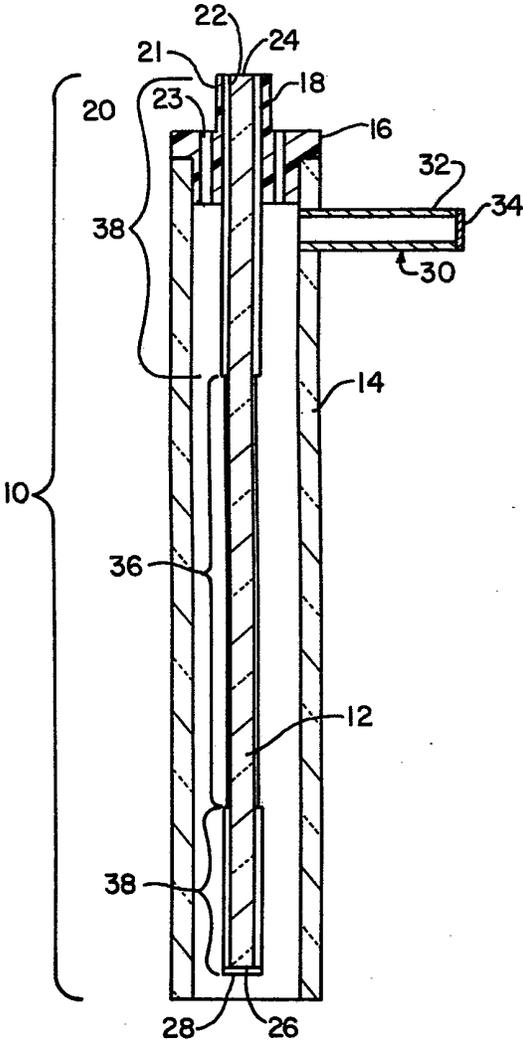


FIG. 2

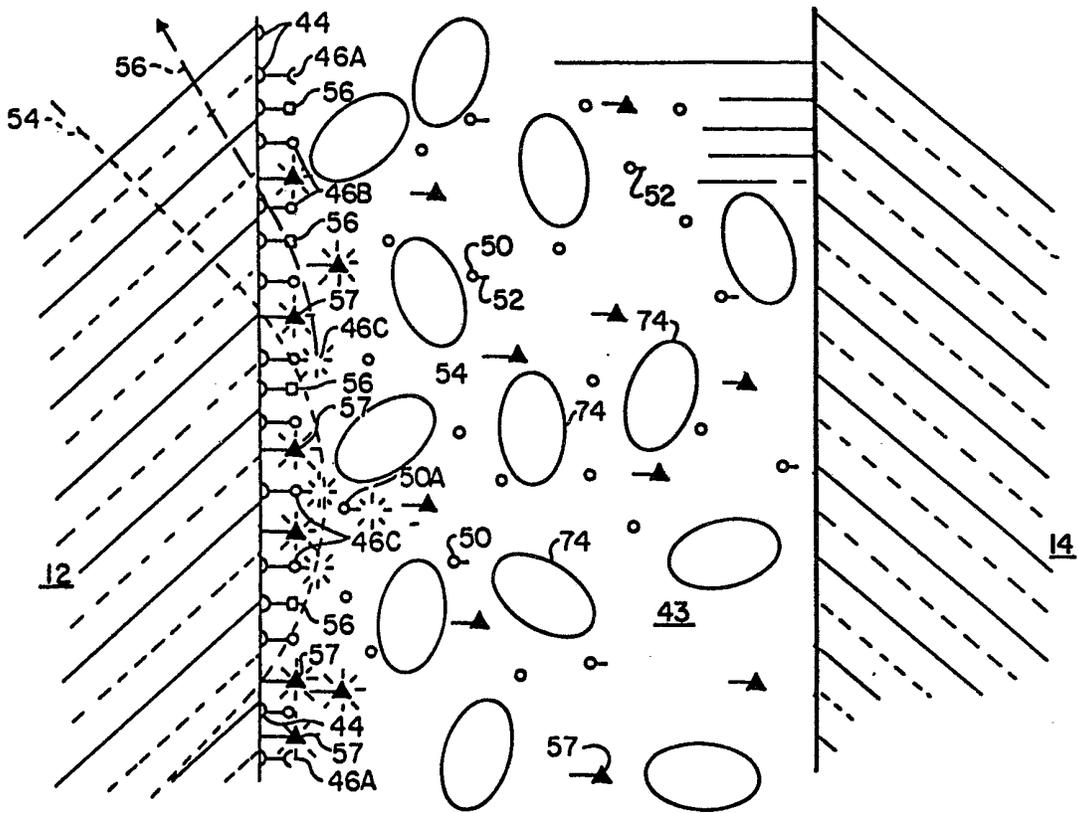


FIG. 3