



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) **EP 1 343 586 B1**

(12) **FASCICULE DE BREVET EUROPEEN**

(45) Date de publication et mention  
de la délivrance du brevet:  
**20.04.2005 Bulletin 2005/16**

(21) Numéro de dépôt: **01998402.0**

(22) Date de dépôt: **27.11.2001**

(51) Int Cl.7: **B01L 3/00**

(86) Numéro de dépôt international:  
**PCT/FR2001/003743**

(87) Numéro de publication internationale:  
**WO 2002/043865 (06.06.2002 Gazette 2002/23)**

(54) **PROCEDES DE CONCENTRATION D'UN ANALYTE PRESENT DANS UN ECHANTILLON**  
**VERFAHREN ZUM KONZENTRIEREN VON ANALYTEN IN PROBEN**  
**METHODS FOR CONCENTRATING AN ANALYTE PRESENT IN A SAMPLE**

(84) Etats contractants désignés:  
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU**  
**MC NL PT SE TR**

(30) Priorité: **29.11.2000 FR 0015417**

(43) Date de publication de la demande:  
**17.09.2003 Bulletin 2003/38**

(73) Titulaires:  
• **COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE**  
**75752 Paris Cédex 15 (FR)**  
• **BIOMERIEUX SA**  
**69280 Marcy l'Etoile (FR)**

(72) Inventeurs:  
• **PUGET, Pierre**  
**F-38330 SAINT ISMIER (FR)**

• **POUTEAU, Patrick**  
**F-38340 VOREPPE (FR)**  
• **GINOT, Frédéric**  
**F-38120 Saint Egreve (FR)**  
• **CAILLAT, Patrice**  
**F-38130 ECHIROLLES (FR)**

(74) Mandataire: **Poulin, Gérard et al**  
**Société BREVATOME**  
**3, rue du Docteur Lancereaux**  
**75008 Paris (FR)**

(56) Documents cités:  
**WO-A-00/50172** **WO-A-94/26414**  
**WO-A-98/10267** **US-A- 5 498 392**  
**US-A- 5 863 502** **US-A- 6 074 827**

**EP 1 343 586 B1**

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

## Description

### Domaine technique

[0001] La présente invention se rapporte à un procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon selon les revendications 1 et 2.

[0002] Elle s'inscrit dans tous les domaines dans lesquels il existe un besoin de transporter un analyte d'une première solution à une deuxième solution, ceci par exemple pour des raisons d'incompatibilité de la solution constituée par l'échantillon, ou d'éléments présents dans cette solution, avec un réactif ou un procédé chimique ciblant l'analyte.

[0003] Elle s'inscrit également dans tous les domaines dans lesquels il existe un besoin de concentrer un analyte pour pouvoir le mettre en évidence par exemple en le faisant réagir avec un réactif par exemple de transformation et/ou de mise en évidence de l'analyte.

[0004] Par exemple, de nombreux tests de diagnostic in vitro consistent à faire réagir chimiquement un analyte recherché avec un réactif adéquat. Le ou un des produits de la réaction est ensuite détecté directement ou indirectement.

[0005] On peut citer par exemple les tests immunologiques dans lesquels la réaction chimique est une reconnaissance anticorps/antigène, ou de façon plus générale une réaction protéine/ligand, et les tests par sondes d'acide(s) nucléique(s) dans lesquels on détecte une hybridation entre acides nucléiques.

[0006] Un test de diagnostic est d'autant meilleur qu'il présente à la fois une sensibilité et une spécificité élevées. Il est d'autant plus sensible qu'il permet de détecter une quantité faible d'analyte recherché. Il est d'autant plus spécifique qu'il n'est positif que pour l'analyte recherché et non pour des analytes semblables..

[0007] On entend par analyte tout ou partie de corpuscule ou molécule que l'on désire isoler, changer de milieu et/ou concentrer pour être utilisé et/ou mis en évidence tel qu'un microorganisme, une bactérie, un champignon, un virus, une cellule eucaryote ; un composé chimique ; une molécule telle qu'un peptide, une protéine, un enzyme, un polysaccharide, un lipide, une lipoprotéine, un lipopolysaccharide, un acide nucléique, une hormone, un antigène, un anticorps, un facteur de croissance, un haptène ; une cellule telle qu'une cellule tumorale etc.

### Etat de la technique

[0008] De nombreux tests de diagnostic sont réalisés après des étapes d'extraction des analytes cibles des échantillons biologiques, de purification pour éliminer des produits parasites qui pénalisent les performances du test, de concentration des analytes cibles pour augmenter la quantité d'analyte par unité de volume de tampon, et de mise en solution des analytes cibles dans un tampon pour les rendre accessibles chimiquement.

[0009] En outre, pour augmenter la sensibilité et la spécificité d'un test permettant de mettre en évidence un analyte, il est parfois nécessaire de réduire le volume du tampon dans lequel se trouve les exemplaires de l'analyte recherché, tout en conservant l'intégralité de ce dernier.

[0010] Les biologistes ont des moyens tout à fait classiques de concentration d'un analyte utilisant notamment des techniques de centrifugation, de filtration et/ou de sédimentation magnétique. Ces techniques nécessitent des transferts de solutions et des manipulations de l'analyte qui conduisent à une réduction inévitable de la quantité d'analyte analysable.

[0011] Par exemple dans les procédés de centrifugation et de sédimentation magnétique, les étapes de centrifugation ou de sédimentation magnétique proprement dites peuvent devoir être répétées plusieurs fois, la limite du nombre de répétitions étant imposée par le volume minimal de solution qui peut être manipulé facilement et de façon fiable avec une pipette classique. Ce volume minimal est de l'ordre de la dizaine de microlitre. En-deçà, on perd du liquide et donc de l'analyte en le transportant dans des "gros" contenants tels que des cônes de pipettes, des flacons, etc. En outre, il se pose des problèmes d'évaporation et d'adsorption sur les parois des contenants lors de ces manipulations.

[0012] Le document WO-A-9426414 décrit un procédé de transport d'un analyte fixé à des particules magnétiques d'un premier contenant vers un deuxième.

[0013] Dans le cas d'une concentration faible d'analyte dans l'échantillon au départ, ceci peut provoquer la disparition totale de l'analyte ou une diminution de sa quantité telle qu'il peut devenir indétectable.

[0014] Outre les inconvénients précités, ces manipulations sont coûteuses en matériel et prennent beaucoup de temps.

[0015] Ceci reste un problème constant pour de nombreuses applications industrielles, par exemple la détection de microorganismes pathogènes dans un prélèvement biologique ou un échantillon industriel.

[0016] Il existe donc un réel besoin d'un procédé et d'un dispositif permettant de faire passer un analyte d'une première solution à une deuxième solution et/ou de concentrer un analyte tout en conservant la quantité d'analyte présente au départ, ceci par exemple afin d'accroître la sensibilité et la spécificité des tests de diagnostic et de toute réaction chimique dirigée vers l'analyte, et de pallier les inconvénients précités.

[0017] La présente invention répond à ce besoin, et présente non seulement l'avantage de pallier aux inconvénients précités, mais aussi de nombreux autres avantages que l'homme du métier ne manquera pas de relever.

### Exposé de l'invention

[0018] La présente invention fournit un procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon

dans lequel :

- on prépare à partir de l'échantillon, dans un premier contenant de volume  $\alpha$  relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant de volume  $\beta$ , le volume  $\beta$  étant plus petit que le volume  $\alpha$ , une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules magnétiques,
- on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant jusqu'au goulet d'étranglement,
- on libère l'analyte fixé sur les particules magnétiques desdites particules au niveau du goulet d'étranglement, et
- on transporte par déplacement de liquide l'analyte du goulet d'étranglement vers le deuxième contenant, les particules magnétiques étant maintenues au niveau dudit goulet d'étranglement.

**[0019]** La présente invention fournit également un procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

- on prépare à partir de l'échantillon une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules magnétiques,
- on introduit la solution A dans un premier contenant de volume  $\alpha$  relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant de volume  $\beta$ , le volume  $\beta$  étant plus petit que le volume  $\alpha$ ,
- on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant jusqu'au goulet d'étranglement,
- on libère l'analyte fixé sur les particules magnétiques desdites particules au niveau du goulet d'étranglement, et
- on transporte par déplacement de liquide l'analyte du goulet d'étranglement vers le deuxième contenant, les particules magnétiques étant maintenues au niveau dudit goulet d'étranglement.

**[0020]** Les analytes sont définis ci-dessus.

**[0021]** La préparation de la solution A à partir de l'échantillon comprend une étape dans laquelle l'analyte est fixé de préférence de façon réversible sur des particules magnétiques. L'utilité de cette réversibilité est expliquée ci-dessous.

**[0022]** Les particules magnétiques ont une taille adéquate notamment avec l'analyte à isoler, et avec le volume de solution A. Elles peuvent être de taille sub-micrométrique par exemple lorsque l'analyte est une molécule.

**[0023]** La quantité de particules utilisée est fonction notamment de la nature et de la quantité d'analyte à fixer, elle est de préférence en nombre suffisant pour fixer la totalité de l'analyte. Les particules magnétiques utilisables dans le procédé de la présente invention peuvent être par exemple des produits tels que ceux de la

marque de commerce Dynabeads de la société Dynal (Norvège) ou MACS de la société Miltenyi Biotec (Allemagne), ou encore des produits de la société Immulon Corp. (USA).

**[0024]** D'une manière générale, les particules magnétiques utilisables sont classiquement utilisées en biologie moléculaire et cellulaire. Elles doivent être en particulier superparamagnétiques afin de rediffuser spontanément après annulation du champ magnétique.

**[0025]** Des exemples de protocoles de fixation ou de capture de l'analyte sur les particules magnétiques peuvent être trouvés par exemple dans les références *Bioscience Product Catalogue 2000*, et *Miltenyi Biotec, Tri Magnétique de Cellules, Séparation de biomolécules 1999*. Les principales particules disponibles sont les particules de Dynal, Seradyn, BioMag, Spherotec ou Estapor (marques déposées). De telles particules peuvent être revêtues d'oligonucléotides de capture, par adsorption ou covalence. Les documents US-A-4,672,040 et US-A-5,750,338 décrivent des procédés utilisables pour la présente invention. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de -ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet déposées par l'un des demandeurs sous les références suivantes :

- PCT/FR 97/00912 sous priorité française du 24 mai 1996, et
- PCT/FR 99/00011 sous priorité française du 6 janvier 1998.

**[0026]** Dans la dernière de ces demandes de brevet, il s'agit de particules magnétiques thermosensibles ayant chacune un noyau magnétique recouvert d'une couche intermédiaire. La couche intermédiaire est elle-même recouverte par une couche externe à base d'un polymère susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique, le polymère externe est thermosensible et présente une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée comprise entre 10 et 100°C et de préférence entre 20 et 60°C. Cette couche externe est synthétisée à partir de monomères cationiques, qui génèrent un polymère ayant la capacité de lier les acides nucléiques. Cette couche intermédiaire isole les charges magnétiques du noyau, afin d'éviter les problèmes d'inhibition des techniques d'amplification de ces acides nucléiques.

**[0027]** Selon l'invention, les particules magnétiques libérées de l'analyte peuvent être déplacées hors du deuxième contenant au moyen d'un système magnétique. Ceci peut être utile par exemple pour éviter toute interaction préjudiciable des particules avec les analytes libérés et/ou avec des réactifs chimiques et/ou des moyens utilisés pour le mettre en évidence.

**[0028]** Selon l'invention, la libération de l'analyte recherché, ou élution de l'analyte, peut être effectuée par exemple dans une solution tampon par exemple par chauffage ou un autre procédé adéquat. Les procédés

de libération utilisables sont tous les procédés classiques de l'état de l'art. Les techniques chromatographiques offrent toute une panoplie de techniques de libération de protéines ou autre ligand utilisables dans le procédé de la présente invention, telles qu'un changement de pH ou un changement de force ionique, ou un changement de solvant, ou encore le passage en tampon contenant de l'EDTA ou toute autre substance chélatante des cations métalliques si l'analyte est fixé à la particule par une technique de métal-chélate. Si l'analyte est un oligonucléotide, on peut par exemple chauffer à une température de 50 à 60°C pour un oligonucléotide de longueur de 15 à 25 bases pour dissocier tous les analytes des particules magnétiques.

**[0029]** Selon l'invention, le système magnétique est un système permettant de créer un champ magnétique fixe ou variable engendrant l'application d'une force sur les billes magnétiques, capable de les immobiliser ou de les déplacer. Il peut être constitué d'un ensemble d'aimants ou de bobines.

**[0030]** Il peut s'agir également d'une bobine intégrée, réalisée par exemple par des procédés de micro-technologie tel qu'un dépôt de matériaux et de résines photosensibles de masquage, une insolation de ces résines, des gravures de motifs à l'échelle du micron, par exemple. Des bobines de ce type sont par exemple fabriquées collectivement au moyen des technologies précitées pour réaliser des têtes de lecture/écriture de disques durs.

**[0031]** Selon l'invention, après avoir été transportées, les particules magnétiques peuvent être 'remises en suspension, par exemple dans le deuxième contenant, par annulation du champ magnétique créé par le système magnétique.

**[0032]** Selon une variante de la présente invention, les inventeurs fournissent également un procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

on prépare à partir de l'échantillon une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules magnétiques,

- on introduit la solution A dans un premier contenant de volume  $\alpha$  relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant de volume  $\beta$ , le volume  $\beta$  étant plus petit que le volume  $\alpha$ ,

- on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant jusqu'au goulet d'étranglement,

- on libère l'analyte fixé sur les particules magnétiques desdites particules au niveau du goulet d'étranglement,

- on transporte par déplacement d'un liquide l'analyte du goulet d'étranglement vers le deuxième contenant.

**[0033]** Selon une variante du procédé de concentration de la présente invention, l'analyte peut être libéré

dans le deuxième contenant, et l'analyte peut être déplacé soit sous transport du liquide contenant les analytes, soit avec transport par déplacement d'un liquide du second contenant vers un troisième contenant.

**[0034]** Selon l'invention, on peut déplacer les particules magnétiques libérées de l'analyte du deuxième contenant au premier contenant via le goulet d'étranglement, ou du goulet d'étranglement audit premier contenant, au moyen d'un système magnétique.

**[0035]** Selon l'invention, comme décrit ci-dessus, l'analyte peut être libéré des particules magnétiques par modification des conditions physiques ou chimiques par exemple par chauffage ou par réaction avec au moins une substance présente dans l'autre solution.

**[0036]** Selon l'invention, un agent d'immobilisation de l'analyte peut être fixé sur tout ou partie d'au moins une paroi du deuxième contenant ou de tout support solide présent dans ledit deuxième contenant. De tels supports peuvent par exemple être constitués par des billes de silice, des billes de verre pleines, creuses ou poreuses, des particules de quartz, des grains de sable, des grains de vermiculite, zéolite et/ou feldspath, de la laine de verre et/ou de roche, des billes d'argile, des particules de liège, des billes de polystyrène, de polyéthylène, de polypropylène, de polyéthylène de petite taille agglomérées, de porosité et d'épaisseur variables, de billes de latex, de billes revêtues de gélatine, et de grains de résine.

**[0037]** Selon l'invention, le goulet d'étranglement peut être sous la forme d'un capillaire. Cette forme peut être intéressante par exemple pour limiter la diffusion de l'analyte du deuxième contenant vers le premier contenant lorsque ledit analyte a été libéré des particules magnétiques.

**[0038]** La présente invention fournit également un procédé de mise en évidence d'un analyte dans un échantillon dans lequel :

- on procède à une concentration de l'analyte au moyen d'un procédé de concentration de la présente invention,
- on met en évidence l'analyte dans le deuxième contenant ou dans tout autre contenant relié directement ou indirectement au deuxième contenant.

**[0039]** Le deuxième contenant ou chambre de réaction ou tout autre contenant relié directement ou indirectement au deuxième contenant peut contenir un ou des réactif(s) secs ou en solution destiné(s) à réagir directement ou indirectement avec l'analyte. Par indirectement on entend que plusieurs réactions chimiques successives peuvent être réalisées sur l'analyte ou un de ses dérivés obtenu. Des particules magnétiques sous forme de pastilles sont décrites dans l'état de la technique, par exemple dans le document EP-A-0 811 694. La fabrication des pastilles est également bien décrite dans l'état de la technique, par exemple dans les documents US-A-4,678,812 et US-A-5,275,016. Cette fabri-

cation évoquée ci-dessus peut être utilisée pour la synthèse des autres pastilles qui seront exposées par la suite, telles que :

- une pastille qui comporte des constituants structuraux, comme des dNTP, des amorces ou des ions, permettant l'amplification ultérieure telle que décrite dans le brevet US-A-5,098,893 ou l'article "Ambiant-temperature-stable molecular biology reagents" R. Ramanujam et al., Product Application Focus, vol. 14, n°3 (1993), 470-473, par exemple,
- une pastille contenant des constituants fonctionnels, tels que des enzymes qui, associés avec les constituants structurels précédemment cités, permettent la conduite d'une amplification. Des exemples de telles pastilles sont donnés dans le brevet US-A-4 891 319, les demandes de brevet WO-A-87/00196 et WO-A-95/33488 ou l'article "Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose : simplified molecular biology", de C. Colaço et al., Bio/Technology, vol. 10, September 1992, 1007-1011.

**[0040]** On peut par exemple prévoir, selon la présente invention, des plots d'hybridation fixés sur une surface du deuxième contenant de manière à ce qu'ils soient accessibles à l'analyte lorsqu'il se trouve dans le deuxième contenant. Ceci peut être réalisé par exemple sous la forme d'une puce à ADN intégrée. Ainsi, selon la présente invention, lorsque l'analyte à mettre en évidence est un acide nucléique, il peut être mis en évidence par une technologie de puce à acide nucléique.

**[0041]** Selon la présente invention, le deuxième contenant peut donc être un réservoir d'un microcomposant, par exemple d'une biopuce, par exemple d'une puce à ADN. Par biopuce, on entend tout support solide sur lequel sont fixés des ligands, et en particulier par une puce à ADN, on entend tout support solide sur lequel sont fixés des acides nucléiques. La méthode de fixation des ligands peut être réalisée de différentes manières et notamment par adsorption ou covalence comme par exemple la synthèse in situ par les techniques de photolithographie ou par un système piézo-électrique, par dépôt capillaire de ligands préformés. A titre d'illustration, des exemples de ces biopuces appliqués aux puces à ADN sont donnés dans les publications de G. Ramsay, Nature Biotechnology, 16, p. 40-44, 1998 ; F. Ginot, Human Mutation, 10, p. 1-10, 1997 ; J. Cheng et al., Molecular diagnosis, 1(3), p. 183-200, 1996 ; T. Livache et al., Nucleic Acids Research, 22(15), p. 2915-2921, 1994 ; J. Cheng et al., Nature Biotechnology, 16, p. 541-546, 1998 ou dans les brevets US 4,981,783 (Augenlicht), US 5,700,637 (Southern), US 5,445,934 (Fodor), US 5,744,305 (Fodor), US 5,807,522 (Brown).

**[0042]** Selon l'invention, le deuxième contenant peut être aussi une chambre d'entrée vers un autre contenant d'un autre procédé. Ainsi, le deuxième contenant peut être relié directement ou indirectement à un autre

contenant utilisé pour d'autres réactions chimiques ou étapes de procédé ciblant l'analyte ou un de ses dérivés telle qu'une purification, une amplification, un marquage, etc. Par exemple, l'autre contenant ou chambre peut être une chambre de PCR pour amplifier un gène, éventuellement avec ensuite une analyse dans un laboratoire sur puce ("micro-total analysis system" : MicroTas).

**[0043]** Néanmoins, toutes les techniques d'amplification peuvent être utilisées. Ainsi, pour l'amplification des acides nucléiques, il existe entre autres les techniques suivantes :

- PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4 683 195, US-A-4 683 202 et US-A-4 800 159,
- LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0 201 184,
- RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069,
- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818,
- SPSR (Single Primer Sequence Replication) avec le brevet US-A-5 194 370, et
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5 399 491.

**[0044]** Selon l'invention, d'autres réactifs peuvent être utilisés, tels que des réactifs lyophilisés, par exemple pour faire un test homogène de détection de l'analyte, par exemple par transfert de fluorescence.

**[0045]** Selon l'invention, de manière non limitative, l'analyte est défini ci-dessus.

**[0046]** On dispositif de transport d'un analyte fixé sur des particules magnétiques présent dans un liquide est décrit, ledit dispositif comprenant :

- un premier contenant destiné à contenir un liquide et relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant,
- un système magnétique permettant de déplacer les particules magnétiques sur lesquelles est fixé l'analyte du premier contenant au deuxième contenant via le goulet d'étranglement.

**[0047]** Les volumes des premier et deuxième contenants sont de préférence adaptés aux volumes de solutions à manipuler. Ces volumes peuvent être inférieurs ou égaux à 10 ml.

**[0048]** Un autre dispositif de concentration d'un analyte fixé sur des particules magnétiques présent dans un liquide comprend :

- un premier contenant de volume  $\alpha$  destiné à contenir un liquide relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant,
- ledit deuxième contenant de volume  $\beta$  plus petit que

le volume  $\alpha$  du premier contenant, et

- un système magnétique permettant de déplacer les particules magnétiques sur lesquelles est fixé l'analyte du premier contenant au deuxième contenant via le goulet d'étranglement.

**[0049]** Certains éléments de ces dispositifs ont déjà été décrits pour le procédé de la présente invention, et devront être pris en considération avec la description ci-dessous.

**[0050]** Ces contenants sont utilisables par exemple comme chambres de réaction. Les techniques précitées permettent également de réaliser des capillaires de section de quelques microns-carrés à quelques centaines de milliers de microns-carrés pour le transfert de solutions, ou d'un analyte fixé sur des microparticules, selon la présente invention, d'un premier contenant à un deuxième contenant, par exemple d'une chambre de réaction à une autre chambre de réaction.

**[0051]** Le rapport des volumes  $\alpha/\beta$  peut être par exemple de 10 à 1000.

**[0052]** Le premier contenant peut par exemple avoir un volume d'environ 0,1 à 100  $\mu\text{l}$ .

**[0053]** Le deuxième contenant peut avoir un volume d'environ 0,01 à 1  $\mu\text{l}$ .

**[0054]** L'invention permet donc une réduction de volume qui est de 100 à 1000 fois supérieure à ce qui pouvait être atteint par les pratiques de laboratoire ou de systèmes "macroscopiques" automatisés de l'art antérieur manipulant des liquides avec des pipettes et des flacons de quelques dizaines de microlitres. Elle permet de ce fait de concentrer un échantillon par le même facteur 100 à 1000.

**[0055]** En effet des techniques de photolithographie de substrats solides, par exemple de silicium, de silice, ou de verre, ou de moulage de grande précision de matières plastiques, permettent la réalisation de contenants de dimensions submillimétriques, voire de l'ordre de quelques microns dans au moins une direction, qui peuvent donc avoir des volumes réduits à des fractions de micro-litre.

**[0056]** Le premier contenant et/ou le deuxième contenant peuvent/peut avoir une forme qui converge vers ledit goulet d'étranglement. Le goulet d'étranglement peut être par exemple sous la forme d'un capillaire tel que décrit dans le paragraphe précédent.

**[0057]** Le goulet d'étranglement peut par exemple avoir une section comprise entre 1  $\mu\text{m}^2$  à 1  $\text{mm}^2$ , préférentiellement 100  $\mu\text{m}^2$  à 0,1  $\text{mm}^2$ .

**[0058]** Le deuxième contenant et/ou le goulet d'étranglement peut/peuvent être muni(s) de canaux d'entrée/sortie de fluides. Ces canaux ont bien entendu une section adaptée en fonction des volumes de solution qu'ils sont destinés à contenir. Ainsi, par exemple pour une mise en évidence de l'analyte, lorsqu'il s'agit d'un acide nucléique, dans le deuxième contenant par une hybridation sur des sondes de capture portées par un support solide, ces canaux peuvent être utilisés pour faire les

lavages nécessaires avant l'étape de lecture.

**[0059]** Les dispositifs précités peuvent comprendre un événement sous forme de capillaire présent au niveau du deuxième contenant et reliant directement celui-ci à l'extérieur. Lors des opérations de remplissage et/ou de transfert de fluide dans le deuxième contenant, cet événement sert à évacuer le fluide initialement présent dans le contenant que ce soit de l'air ou du liquide. La présence d'air dans le deuxième contenant n'est qu'une éventualité. Il peut y avoir des événements à d'autres endroits, par exemple au niveau du goulet d'étranglement, du premier contenant etc. Ces événements de mise à l'air libre peuvent être commandés par exemple par des vannes à billes.

**[0060]** L'invention permet donc grâce à l'utilisation de techniques de micro-technologies de s'intégrer dans les dispositifs appelés aujourd'hui labopuce, ou "lab-on-a-chip" ou bien encore "micro-Total-Analysis-System" (MicroTAS) dans la terminologie anglo-saxonne.

**[0061]** Dans l'exemple "lab-on-a-chip" le dispositif utilisable dans la présente invention peut être combiné à d'autres fonctions pour former un système plus complet et plus précis d'analyse biologique.

**[0062]** Par exemple, le dispositif de la présente invention peut être le premier élément d'un ensemble comprenant :

1. un module de concentration/réduction de volume,
2. un module d'amplification,
3. un module de séparation, par exemple par électrophorèse,
4. un module de détection.

**[0063]** Un exemple de dispositif intégré comprenant les éléments 2, 3 et 4 ci-dessus est décrit dans la référence M.A. Burns et al. , *An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device*, Science, vol 282, 16 oct 98.

**[0064]** Dans certaines réalisations de la présente invention, les concepts de chambre de réaction et de canaux de transfert peuvent donc se confondre puisque ces labopuces permettent la réalisation de procédés en continu pour lesquels les réactions se font dans des capillaires, par exemple dans certaines techniques d'électrophorèse capillaire et de PCR.

**[0065]** L'invention peut par exemple être utile quand l'analyte recherché est initialement présent dans un échantillon de grand volume mais en quantité limitée.

**[0066]** L'invention proposée permet, par exemple par la mise en oeuvre des micro-technologies précitées, de concentrer une solution de molécules que l'on veut détecter, ou de déplacer un analyte d'une première solution vers une deuxième solution dans un volume inférieur au microlitre, complètement inaccessible par les procédés classiques de laboratoire.

**[0067]** La présente invention peut être mise en oeuvre par exemple dans un système de diagnostic in vitro automatisé, ou un système de détection de contami-

nants biologiques dans des domaines tels que l'agroalimentaire et/ou le contrôle microbiologique industriel.

**[0068]** L'invention peut être appliquée par exemple pour la détection ultrasensible sans amplification de pathogènes dans un échantillon biologique. Les acides nucléiques des pathogènes potentiellement présents dans un échantillon peuvent être extraits par des techniques habituelles. Ils peuvent ensuite être purifiés et concentrés, toujours par des techniques standards, jusqu'à un volume de tampon de quelques dizaines de microlitres.

**[0069]** L'utilisation du dispositif ou micro-composant permet dans ce cas de concentrer le matériel biologique dans le volume de la chambre de réaction qui correspond au deuxième composant. Là, des étapes ultérieures d'hybridation sur support plan et de détection permettent de détecter la présence ou non d'acides nucléiques de séquence donnée, caractéristique de l'infection de l'échantillon.

**[0070]** L'utilisation de l'invention permet donc d'augmenter très fortement la sensibilité d'un test, à performances égales du système de détection.

**[0071]** La présente invention peut par exemple être appliquée pour améliorer les immuno-essais. En effet, pour les immuno-essais dans lesquels se pose un problème de sensibilité, l'utilisation de l'invention, comme précédemment décrite, en concentrant le matériel biologique dans un volume très faible, permet d'augmenter fortement leur sensibilité.

**[0072]** Pour les immuno-essais où la quantité de matériel biologique à détecter est suffisante, l'utilisation de l'invention permet de concentrer le prélèvement, et donc de diminuer la durée de la réaction immunologique.

**[0073]** D'autres caractéristiques et avantages apparaîtront encore dans les exemples ci-dessous, donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif, en référence aux figures annexées.

### Brève description des figures

#### **[0074]**

- La figure 1 est une représentation schématique en perspective et éclatée avec une coupe partielle d'un premier mode de réalisation d'un dispositif utilisable selon la présente invention,
- La figure 2 est une représentation schématique en perspective et éclatée d'un deuxième mode de réalisation d'un dispositif utilisable selon la présente invention,
- La figure 3 est une représentation schématique en perspective et éclatée avec une coupe partielle d'un troisième mode de réalisation d'un dispositif utilisable selon la présente invention,
- La figure 4 est une représentation schématique d'un premier aimant utilisable pour la mise en oeuvre de la présente invention, et
- La figure 5 est une représentation schématique d'un deuxième aimant utilisable pour la mise en oeuvre

de la présente invention.

**[0075]** Sur ces figures, les références identiques indiquent des éléments identiques.

### Exemples

#### Exemple 1 : exemple de préparation de la solution A

**[0076]** L'échantillon biologique est traité par des moyens classiques de biologie moléculaire pour obtenir une solution contenant les molécules d'ARN cible à détecter ; cette solution a un volume de 200 microlitres et la solution tampon est la suivante : Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1M, triton X-100 0,05%, ADN de saumon 0,14 mg/ml.

**[0077]** On ajoute à cette solution 2 µl d'une solution d'oligonucléotides de capture ; cette solution d'oligonucléotides de capture est constituée de : Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8, oligonucléotide de capture 10<sup>11</sup>/µl ; l'oligonucléotide de capture est un oligonucléotide, biotinylé en 5', d'une séquence par exemple de 32 bases, complémentaire d'une sous-séquence de l'ADN cible. Incubation pendant 2h à 35°C.

Introduction de 1 µl de particules Immunicon Corporation, streptavidine ferrofluide, non diluées. Incubation 30 minutes à 35°C.

**[0078]** Dans ces conditions, plus de 95% des molécules cibles se trouvent immobilisées sur les particules magnétiques.

#### Exemple 2 : dispositif selon un premier mode de réalisation

**[0079]** Le dispositif ou composant décrit dans cet exemple est un micro-composant qui permet de réduire d'un facteur 100 à 1000 le volume de tampon dans lequel se trouve un analyte recherché, tout en conservant la quantité d'analyte présente dans l'échantillon initial.

**[0080]** L'architecture générale du composant 1 est représentée à la figure 1. Il est constitué d'une chambre d'introduction 3, éventuellement prolongée par un dispositif d'introduction constitué des pièces 13 et 15, reliée à une chambre de réaction 7 par l'intermédiaire d'un goulet d'étranglement 5, ici représenté sous la forme d'un capillaire. Les formes particulières des deux chambres sont données à titre d'exemple. Les chambres et le capillaire peuvent être de forme ou de taille différente suivant l'application ou la technologie de fabrication du composant. La figure 1 suggère un mode de fabrication selon lequel le composant est fabriqué en gravant les chambres et le goulet d'étranglement dans un matériau plan, puis en assemblant par collage ou tout autre mode de fixation le couvercle 11. C'est un mode de fabrication possible, mais les procédés de l'invention ne sont pas dépendantes de ce mode de fabrication. Toute autre technologie, en particulier :

- permettant de creuser un matériau directement pour réaliser des cavités de la forme des chambres et du goulet d'étranglement,
- ou qui consisterait à creuser les chambres 3 et 7 ainsi que le goulet d'étranglement dans la plaque supérieure, dans l'exemple dans le couvercle 11, au lieu de les creuser dans la plaque inférieure,

pourrait être utilisée pour fabriquer le dispositif.

**[0081]** On peut citer par exemple les techniques à l'image de la "LIGA" utilisant la lithographie, la galvanoplastie et le moulage.

**[0082]** Un événement 9 permet l'évacuation des fluides air ou liquide lorsqu'on remplit ou transfère des liquides dans les chambres.

**[0083]** L'échantillon et les différents réactifs ou tampons peuvent être introduits dans les dispositifs de différentes manières. Nous en donnons deux ici à titre d'exemples.

**[0084]** Ce premier mode de réalisation, illustré sur la figure 1, est réalisé en pratiquant un orifice dans le couvercle 11 du dispositif et en équipant cet orifice d'une cuvette conique 15. Une pièce cylindrique 13 sert à maintenir la cuvette conique en position et à assurer l'étanchéité entre la cuvette conique et le dispositif. En appliquant par exemple une pipette, un embout de diluteur ou de seringue, sur la cuvette conique, on peut "pousser" le tampon ou un réactif à l'intérieur du dispositif en exerçant une pression sur le liquide. L'air ou tout autre fluide liquide ou gazeux initialement présent dans le dispositif sera évacué du dispositif par l'événement 9. Cet événement débouche ici dans la chambre de réaction, mais il pourra être placé suivant les cas à d'autres endroits du dispositif. On pourra même éventuellement disposer de plusieurs événements.

**[0085]** Un second mode de réalisation pour l'introduction de liquide dans le dispositif est représenté à la figure 2. Dans ce mode de réalisation 1(a), les liquides sont introduits par un capillaire 17, lui-même connecté à l'extérieur du dispositif par une interface, non représentée sur la figure. Le couvercle 19 ne comprend pas d'orifice.

#### Exemple 3 : concentration avec transport sur particules magnétiques

**[0086]** Le procédé décrit dans cet exemple permet de réduire d'un facteur 100 à 1000 le volume de tampon dans lequel se trouve un analyte recherché, tout en conservant la quantité d'analyte présente dans l'échantillon initial. Il met en oeuvre le dispositif représenté dans l'exemple précédent.

**[0087]** Le composant est préalablement rempli de tampon sans analyte recherché et sans particule magnétique. Ce tampon peut être introduit en versant la quantité nécessaire dans la cuvette conique 15 représentée sur la figure 1, et en appliquant une pression pneumatique dans cette cuvette conique. Une fois le composant rempli, le tampon en excès présent dans la

cuvette conique 15 est retiré, par exemple à l'aide d'une pipette.

**[0088]** L'échantillon composé d'une certaine quantité de tampon, par exemple de l'ordre de 30  $\mu$ l, dans lequel les analytes recherchés ont été préalablement fixés sur des particules magnétiques est déposé dans la cuvette conique 15.

**[0089]** Les particules magnétiques sont ensuite attirées vers le fond de la chambre d'introduction 3 (figure 1) à l'aide d'un aimant, par exemple l'aimant 30 de la forme indiquée à la figure 4 positionné sous le dispositif, à l'aplomb de la cuvette conique. Les particules magnétiques sont alors rassemblées en un culot de petite taille.

**[0090]** A l'aide d'un autre aimant, par exemple l'aimant 40 de la forme indiquée à la figure 5, disposé de telle sorte que le dispositif se trouve dans son entrefer 42, le culot est attiré et transporté de sa position initiale dans la première chambre d'introduction 3, à travers le capillaire 5, dans la chambre de réaction 7.

**[0091]** L'analyte est ensuite libéré des particules magnétiques par chauffage (élution) à l'intérieur de la chambre de réaction 7. Pendant cette opération, les particules magnétiques sont éventuellement remises en suspension dans la chambre de réaction 7 en retirant l'aimant.

**[0092]** Les particules magnétiques sont de nouveau rassemblées en un culot dans la chambre de réaction 7 en utilisant à nouveau un aimant, par exemple de la forme présentée sur la figure 4. Elles sont ensuite transportées à nouveau à travers le capillaire 5, mais en sens inverse que précédemment, de la chambre de réaction 7 vers la chambre d'introduction 3, en utilisant un aimant, par exemple de la forme présentée à la figure 5.

**[0093]** Le résultat final de cette suite d'opérations est le transport de la totalité des analytes de la cuvette conique 15 vers la chambre de réaction 7, de volume beaucoup plus faible.

#### Exemple 4 : concentration avec transport fluidique

**[0094]** Le procédé décrit dans cet exemple est une variante du précédent.

**[0095]** Comme précédemment, le composant est préalablement rempli par du tampon sans particule magnétique. L'échantillon composé d'une certaine quantité de tampon, par exemple de l'ordre de 30  $\mu$ l, dans lequel les analytes recherchés ont été préalablement fixés sur des particules magnétiques est déposé dans la cuvette conique 15. Les particules magnétiques sont attirées vers le fond de la chambre d'introduction 3 (figure 1) à l'aide d'un aimant, par exemple de la forme indiquée à la figure 4. Les particules magnétiques sont alors rassemblées en un culot de petite taille.

**[0096]** A l'aide d'un autre aimant, par exemple de la forme indiquée à la figure 5, disposé de telle sorte que le dispositif se trouve dans son entrefer, le culot est attiré et transporté de sa position initiale dans le capillaire 5 (et non plus dans la chambre de réaction 7).

**[0097]** L'analyte est libéré des particules magnétiques par chauffage (élution) à l'intérieur du capillaire 5. Pendant cette opération, les particules magnétiques sont éventuellement remises en suspension dans le capillaire en retirant l'aimant.

**[0098]** Les particules magnétiques sont à nouveau rassemblées en un culot dans le capillaire en utilisant à nouveau un aimant, par exemple de la forme présentée à la figure 4. A ce moment, les analytes sont libres en solution à l'intérieur du capillaire. En poussant du tampon à l'intérieur du dispositif par une surpression au niveau de la cuvette conique 15, on provoque un déplacement de liquide dans le capillaire vers la chambre de réaction 7. Les analytes en solution sont ainsi entraînés par le déplacement du liquide dans la chambre de réaction 7. Les particules magnétiques, elles, restent en position dans le capillaire, maintenues en position sous forme de culot par l'aimant fixe.

**[0099]** Le résultat final de cette suite d'opérations est comme précédemment le transport de la totalité des analytes de la cuvette conique 15 vers la chambre de réaction 7, de volume beaucoup plus faible.

**[0100]** Selon une variante de ce procédé, les particules magnétiques sont sous la forme d'entités sèches déjà présentes dans la chambre d'introduction 3. De telles entités sont bien décrites dans les brevets US-A-5,750,338 et 4,672,040. L'introduction de l'échantillon, dans ladite chambre 3, solubilise les particules magnétiques qui se fixent alors à l'analyte présent dès le départ dans ledit échantillon.

#### Exemple 5 : utilisation de l'invention pour mettre en évidence l'analyte dans un test de détection homogène

**[0101]** Dans cet exemple, l'analyte est mis en évidence en utilisant la technique des "Molecular Beacons", telle qu'elle est décrite dans Tyagi, S. and Kramer, F.R., Nat. Biotechnol. 14:30-308, 1996.

**[0102]** Brièvement, cette technique consiste à mettre les molécules cibles avec des sondes nucléiques, les "Molecular Beacons", qui ont la structure suivante : la séquence sonde, complémentaire de la cible, est prolongée de part et d'autre par deux bras de quelques nucléotides de long, complémentaires l'un de l'autre. Un fluorophore, par exemple le groupe EDANS, est fixé à l'un des bras, alors qu'un inhibiteur de fluorescence, par exemple le groupe DABCYL est fixé à l'autre bras. En l'absence de cible, les deux bras de la sonde s'hybrident l'un sur l'autre et la fluorescence de EDANS est éteinte par le DABCYL. Quand la sonde s'hybride sur la cible, les deux groupes se trouvent éloignés l'un de l'autre, et la fluorescence de EDANS est libérée. Ainsi, la présence et même la concentration de l'analyte, est révélée par le signal de fluorescence et l'intensité de ce signal.

**[0103]** La mise en oeuvre de cette technique dans un dispositif est par exemple la suivante :

1. Préparation de la solution A à analyser, l'analyte

étant un acide nucléique,

2. Remplissage du deuxième contenant 7 du dispositif, ainsi que du goulet d'étranglement 5 et du fond 3 du premier contenant par une solution de révélation, contenant les sondes nucléiques précédemment définies nécessaires à la détection de l'analyte.

3. Introduction de la solution A dans le premier contenant 3 prolongé par le cône 15,

4. Concentration magnétique des particules magnétiques dans le fond du premier contenant 3, puis transport magnétique des particules magnétiques dans le deuxième contenant 7, par exemple selon les modalités décrites dans l'exemple 3,

5. Chauffage à 60°C de l'ensemble du dispositif, attente de 1 à 2 minutes à cette température. L'analyte est alors libéré des particules,

6. Transport magnétique des particules magnétiques du deuxième contenant 7 vers le premier contenant,

7. Mise à la température adéquate pour l'hybridation de la sonde nucléique beacon, par exemple 25°C,

8. Lecture de la fluorescence dans le deuxième contenant 7 par exemple en plaçant le dispositif sous un microscope à épi-fluorescence équipé d'un photomultiplicateur.

**[0104]** L'avantage de cette procédure par rapport à l'état de l'art est de concentrer dans un rapport alpha/béta l'analyte, par exemple de 100 fois, et donc de diminuer relativement la fluorescence résiduelle des sondes "Molecular Beacons", et ainsi augmenter d'autant le rapport signal sur bruit intrinsèque à cette technique de mise en évidence d'un analyte. La sensibilité du test est donc augmentée d'autant.

#### Exemple 6 : utilisation de l'invention pour mettre en évidence l'analyte à l'aide d'une puce à ADN

**[0105]** Dans cet exemple, l'analyte est mis en évidence par hybridation sur une puce à ADN ; la puce à ADN a l'avantage, par rapport à la technique de marquage présentée à l'exemple 5, de pouvoir faire beaucoup d'hybridations en parallèle, donc d'offrir au biologiste une puissance analytique bien plus grande.

**[0106]** Dans cet exemple, le fond du deuxième contenant 7 est une puce à ADN, constituée par exemple d'une vingtaine de plots d'hybridation. La puce est fabriquée par dépôt d'ADN selon les moyens standards de l'état de l'art des puces à ADN.

**[0107]** La mise en oeuvre de cette technique dans un dispositif conforme à l'invention peut être par exemple la suivante :

1. Préparation de la solution A à analyser, l'analyte étant un acide nucléique, marqué par un groupement fluorescent, par exemple de la fluorescéine,

par des moyens classiques de l'état de l'art,

2. Remplissage du deuxième contenant 7 du dispositif, ainsi que du goulet d'étranglement 5 et du fond 3 du premier contenant par le tampon d'hybridation, par exemple : Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 1M, triton X-100 0,05%, ADN de saumon 0,14 mg/ml,

3. Introduction de la solution A dans le premier contenant 15,

4. Concentration magnétique des particules magnétiques dans le fond 3 du premier contenant, puis transport magnétique des particules magnétiques dans le deuxième contenant 7, par exemple selon les modalités décrites dans l'exemple 3,

5. Chauffage à 60°C de l'ensemble du dispositif.

L'analyte est alors libéré des particules,

6. Transport magnétique des particules magnétiques du deuxième contenant 7 vers le premier contenant 3,

7. Hybridation dans les conditions de température et de durée adéquates pour la puce à ADN considérée. Par exemple, hybridation pendant 30 minutes à 40°C,

8. Lavage par passage dans le deuxième contenant 7, au moyen de l'entrée et de la sortie de fluide par les ouvertures 21, 22 représenté sur la figure 3, d'une solution de lavage, par exemple Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1M, triton X-100 0,5%,

9. Lecture de la fluorescence présente sur la puce à ADN, par exemple en mettant le dispositif sous un microscope à épi-fluorescence équipé d'une caméra CCD, et en utilisant un grossissement adéquat.

**[0108]** Comme dans l'exemple précédent, la concentration de l'analyte avant son hybridation sur la puce à ADN permet une réaction plus rapide de l'analyte sur la puce à ADN. Cette accélération de la cinétique par rapport à l'état de l'art permet, soit de diminuer le temps d'hybridation, soit d'augmenter la sensibilité de détection du système, puisque cette sensibilité est en général limitée par la cinétique d'hybridation de l'analyte sur la puce à ADN.

Exemple 7 : utilisation de l'invention comme point d'entrée d'un  $\mu$ TAS

**[0109]** Dans cet exemple, l'invention sert de point d'entrée à un  $\mu$ TAS plus complexe qu'un dispositif composé seulement de deux contenants séparés par un goulet d'étranglement. Nous prenons comme exemple de  $\mu$ TAS celui présenté par l'équipe de A. Northrup, qui consiste en une chambre d'amplification, suivie d'une électrophorèse capillaire des produits amplifiés et d'une détection (voir Anal. Chem. 1996, 68, 4081-4086).

**[0110]** Dans cet exemple, le deuxième contenant est en fait une chambre d'amplification par PCR, par exemple fabriquée par les moyens des microtechnologies.

Ceci signifie que le deuxième contenant est muni d'un moyen de chauffage, d'un moyen de refroidissement, et d'un capteur de température, ce qui permet d'appliquer à l'échantillon liquide contenu dans le deuxième contenant 7 des cycles thermiques. L'entrée-sortie 21, 22 de fluide coupant ce deuxième contenant est le canal d'injection par électrophorèse de l'échantillon amplifié dans le capillaire de séparation. Le capillaire de séparation n'est pas montré sur nos figures (voir figure 1 de l'article sus-cité), ni les microréservoirs permettant l'application des champs électriques nécessaires à l'injection puis à la séparation par électrophorèse.

**[0111]** Le deuxième contenant contient en outre des culots secs contenant tous les produits nécessaires à l'amplification par PCR ; ces produits sont "glassifiés" par des techniques bien connues, et les culots glassifiés, en forme de bille, contenant les divers produits nécessaires à l'amplification, sont déposés dans le deuxième contenant avant mise en place du couvercle. La fabrication de ces culots est bien décrite dans l'état de la technique, par exemple US-A-4,678,812 et US-A-5,275,016.

**[0112]** Le capillaire de séparation contient en outre un gel de séparation, par exemple de l'hydroxy éthyl cellulose, qui lui-même contient un marqueur fluorescent de l'ADN, par exemple le thiazole orange. Ainsi, les fragments d'ADN seront marqués par le thiazole orange au cours de leur migration électrophorétique dans le capillaire de séparation.

**[0113]** L'utilisation d'un tel dispositif est par exemple la suivante :

1. Préparation de la solution A à analyser, l'analyte étant un acide nucléique,
2. Remplissage de l'ensemble du dispositif, notamment des capillaires, par la solution d'électrophorèse ; les culots de réactifs présents dans le deuxième contenant commencent à s'hydrater,
3. Introduction de la solution A dans le premier contenant 15,
4. Concentration magnétique des particules magnétiques dans le fond du premier contenant 3, puis transport magnétique dans le deuxième contenant 7, selon les modalités de l'exemple 3 ci-dessus,
5. Chauffage à 60°C du deuxième contenant 7. Attente de 10 à 30 minutes selon le culot de réactif à dissoudre. En effet, ce chauffage a principalement pour but d'accélérer la remise en solution des culots de réactifs présents dans le contenant,
6. Cyclage thermique pour effectuer l'opération d'amplification des cibles (il existe des particules magnétiques qui ne gênent pas l'amplification, il n'est donc pas nécessaire de les retirer de la chambre d'amplification),
7. Injection par électrophorèse de l'échantillon amplifié dans le capillaire de sortie,
8. Electrophorèse capillaire dans le capillaire de sé-

paration, par exemple, selon les modalités décrites dans l'article suscité,

9. Détection des fragments amplifiés par exemple par un microscope épi-fluorescence équipé d'un photomultiplicateur, le champ du microscope étant situé en fin du capillaire de séparation. 5

**[0114]** Dans cet exemple, le couplage de l'invention à un système intégré d'amplification et d'électrophorèse capillaire permet : 10

- de concentrer l'échantillon avant amplification, par exemple de 100 fois, donc de diminuer le nombre de cycles d'amplification nécessaires (moins 8 cycles environ), ce qui limite les risques intrinsèques à l'amplification (biais d'amplification selon les séquences, risque de contamination croisée, ...), 15
- de diminuer le volume de l'échantillon pour l'amplification, donc de diminuer les quantités de réactifs nécessaires à l'amplification d'où un gain de coût sur les réactifs, 20
- d'augmenter le nombre d'échantillons qu'il est possible de traiter en parallèle dans un même dispositif grâce à la diminution des dimensions de la chambre d'amplification. 25

**[0115]** Par ailleurs, la rapidité avec laquelle s'effectue l'ensemble de la chaîne, de l'ordre de quelques minutes pour le transport magnétique, de 10 à 15 minutes pour l'amplification et de 1 à 2 minutes pour l'électrophorèse capillaire, permet d'obtenir des résultats d'excellente qualité, sans qu'il soit nécessaire d'isoler les compartiments par des vannes. 30

## Revendications

1. Procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

- on prépare à partir de l'échantillon, dans un premier contenant de volume  $\alpha$  relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant de volume  $\beta$ , le volume  $\beta$  étant plus petit que le volume  $\alpha$ , une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules magnétiques, 40
- on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant jusqu'au goulet d'étranglement, 50
- on libère l'analyte fixé sur les particules magnétiques desdites particules au niveau du goulet d'étranglement, et
- on transporte par déplacement de liquide l'analyte du goulet d'étranglement vers le deuxième contenant, les particules magnétiques étant maintenues au niveau dudit goulet d'étranglement. 55

2. Procédé de concentration d'un analyte présent dans un échantillon dans lequel :

- on prépare à partir de l'échantillon une solution A dans laquelle l'analyte est fixé sur des particules magnétiques,
- on introduit la solution A dans un premier contenant de volume  $\alpha$  relié via un goulet d'étranglement à un deuxième contenant de volume  $\beta$ , le volume  $\beta$  étant plus petit que le volume  $\alpha$ ,
- on déplace au moyen d'un système magnétique l'analyte fixé sur les particules magnétiques du premier contenant jusqu'au goulet d'étranglement,
- on libère l'analyte fixé sur les particules magnétiques desdites particules au niveau du goulet d'étranglement, et
- on transporte par déplacement de liquide l'analyte du goulet d'étranglement vers le deuxième contenant, les particules magnétiques étant maintenues au niveau dudit goulet d'étranglement.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel on déplace au moyen d'un système magnétique les particules magnétiques libérées de l'analyte du goulet d'étranglement audit premier contenant.

4. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel l'analyte est libéré des particules magnétiques par modification des conditions physiques ou chimiques.

5. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel un agent d'immobilisation de l'analyte est fixé sur tout ou partie d'au moins une paroi du deuxième contenant ou de tout support solide présent dans ledit deuxième contenant. 35

6. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le goulet d'étranglement est sous la forme d'un capillaire. 40

7. Procédé de mise en évidence d'un analyte dans un échantillon dans lequel :

- on procède à une concentration de l'analyte au moyen d'un procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, et
- on met en évidence l'analyte dans le deuxième contenant ou dans tout autre contenant relié directement ou indirectement au deuxième contenant. 50

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel l'analyte est choisi parmi un microorganisme tel qu'une bactérie, un champignon, un virus, un composé chimique, une molécule telle qu'un peptide, une pro- 55

téine, un enzyme, un polysaccharide, un lipide, une lipoprotéine, un lipopolysaccharide, un acide nucléique, une hormone, un antigène, un anticorps, un facteur de croissance, une cellule tumorale.

9. Procédé selon la revendication 7, dans lequel l'analyte étant un acide nucléique, il est mis en évidence par une technologie de puce à acide nucléique, préférentiellement à ADN.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zum Konzentrieren eines Analyten, der in einer Probe enthalten ist, bei dem man

- ausgehend von der Probe, in einem ersten Behälter mit einem Volumen  $\alpha$ , der durch einen engen Durchgang mit einem zweiten Behälter mit einem Volumen  $\beta$  verbunden ist, wobei das Volumen  $\beta$  kleiner ist als das Volumen  $\alpha$ , eine Lösung A herstellt, in welcher der Analyt an magnetischen Teilchen fixiert ist,
- den an den magnetischen Teilchen des ersten Behälters fixierten Analyten mittels eines magnetischen Systems in den engen Durchgang überführt,
- den an den magnetischen Teilchen fixierten Analyten im Bereich des engen Durchgangs aus den Teilchen freisetzt und
- den Analyten durch Flüssigkeitsverdrängung aus dem engen Durchgang in den zweiten Behälter transportiert, wobei die magnetischen Teilchen im Bereich des engen Durchgangs zurückgehalten werden.

2. Verfahren zum Konzentrieren eines Analyten, der in einer Probe enthalten ist, bei dem man:

- ausgehend von der Probe, eine Lösung A herstellt, in welcher der Analyt an magnetischen Teilchen fixiert ist,
- die Lösung A in einen ersten Behälter mit einem Volumen  $\alpha$  einführt, der über einen engen Durchgang mit einem zweiten Behälter mit einem Volumen  $\beta$  verbunden ist, wobei das Volumen  $\beta$  kleiner ist als das Volumen  $\alpha$ ,
- den an den magnetischen Teilchen fixierten Analyten mittels eines magnetischen Systems aus dem ersten Behälter in den engen Durchgang überführt,
- den an den magnetischen Teilchen fixierten Analyten im Bereich des engen Durchgangs aus den Teilchen freisetzt und
- durch Flüssigkeitsverdrängung den Analyten aus dem engen Durchgang in den zweiten Behälter transportiert, wobei die magnetischen Teilchen im Bereich des engen Durchgangs zu-

rückgehalten werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem man die von dem Analyten befreiten magnetischen Teilchen mittels eines magnetischen Systems aus dem engen Durchgang in den ersten Behälter transportiert.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem der Analyt aus den magnetischen Teilchen freigesetzt wird durch Modifizierung der physikalischen oder chemischen Bedingungen.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem man ein Agens zur Immobilisierung des Analyten an der Gesamtheit oder einem Teil mindestens einer Wand des zweiten Behälters oder irgendeinem festen Träger, der in dem zweiten Behälter vorhanden ist, fixiert.

6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem der enge Durchgang die Form einer Kapillare hat.

7. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, bei dem man

- den Analyten durch Anwendung eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche konzentriert und
- den Analyten in dem zweiten Behälter oder in irgendeinem anderen Behälter, der direkt oder indirekt mit dem zweiten Behälter verbunden ist, nachweist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem der Analyt ausgewählt wird aus Mikroorganismen, wie z.B. einem Bakterium, einem Pilz, einem Virus, einer chemischen Verbindung, einem Molekül, wie z.B. einem Peptid, einem Protein, einem Enzym, einem Polysaccharid, einem Lipid, einem Lipoprotein, einem Lipopolysaccharid, einer Nucleinsäure, einem Hormon, einem Antigen, einem Antikörper, einem Wachstumsfaktor und einer Tumorzelle.

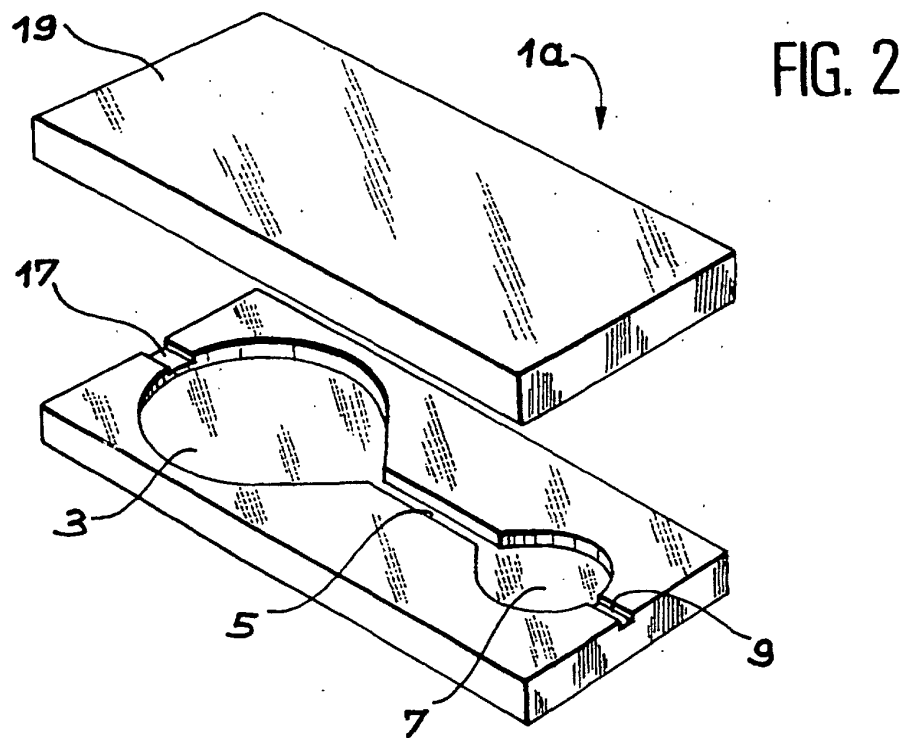
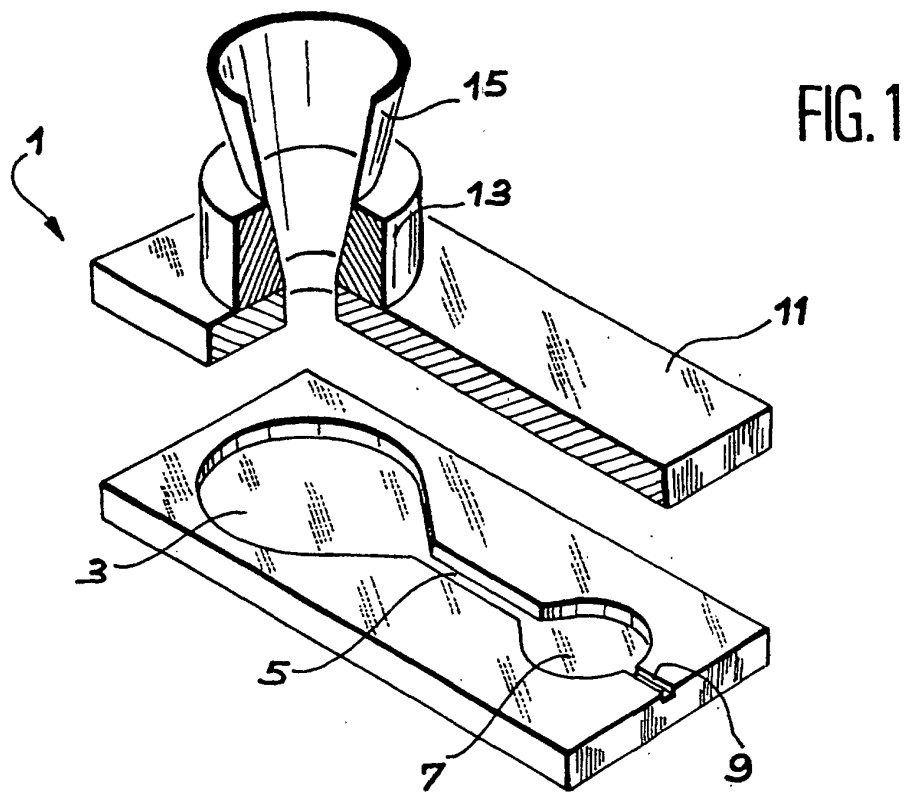
9. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem der Analyt, der eine Nucleinsäure ist, nachgewiesen wird durch eine Nucleinsäure-, vorzugsweise DNA-Chip-Technologie.

#### Claims

1. Method for concentrating an analyte present in a sample wherein:

- a solution A in which the analyte is fixed to magnetic particles is prepared from the sample in a first container of volume  $\alpha$  connected via a bot-

- tleneck to a second container of volume  $\beta$ , the volume  $\beta$  being smaller than the volume  $\alpha$ ,
- using a magnetic system, the analyte fixed to the magnetic particles is moved from the first container to the bottleneck, 5
  - the analyte fixed to the magnetic particles is freed from said particles at the bottleneck and
  - by liquid displacement, the analyte is transported from the bottleneck to the second container, the magnetic particles being maintained at said bottleneck. 10
2. Method for concentrating an analyte present in a sample, wherein: 15
- a solution A in which the analyte is fixed to magnetic particles is prepared from the sample,
  - the solution A is introduced into a first container of volume  $\alpha$  connected via a bottleneck to a second container of volume  $\beta$ , the volume  $\beta$  being smaller than the volume  $\alpha$ , 20
  - using a magnetic system, the analyte fixed to the magnetic particles is moved from the first container to the bottleneck,
  - the analyte fixed to the magnetic particles is freed from said particles at the bottleneck and 25
  - by liquid displacement, the analyte is transported from the bottleneck to the second container, the magnetic particles being maintained at said bottleneck. 30
3. Method according to claim 1 or 2, wherein, using a magnetic system, the magnetic particles freed from the analyte are moved from the bottleneck to said first container. 35
4. Method according to claim 1 or 2, wherein the analyte is freed from the magnetic particles by modifying physical or chemical conditions. 40
5. Method according to claim 1 or 2, wherein an analyte immobilizing agent is fixed to all or part of at least one wall of the second container or any solid support present in said second container. 45
6. Method according to claim 1 or 2, wherein the bottleneck is in capillary form.
7. Method for demonstrating an analyte in a sample, wherein: 50
- the analyte is concentrated by means of a method according to any one of the preceding claims and
  - the analyte is demonstrated in the second container or any other container directly or indirectly connected to the second container. 55
8. Method according to claim 7, wherein the analyte is chosen from among a microorganism such as a bacterium, a fungus, a virus, a chemical compound, a molecule such as a peptide, a protein, an enzyme, a polysaccharide, a lipid, a lipoprotein, a lipopolysaccharide, a nucleic acid, a hormone, an antigen, an antibody, a growth factor and a tumour cell.
9. Method according to claim 7, wherein the analyte is a nucleic acid and is demonstrated by nucleic acid chip technology, preferably DNA.



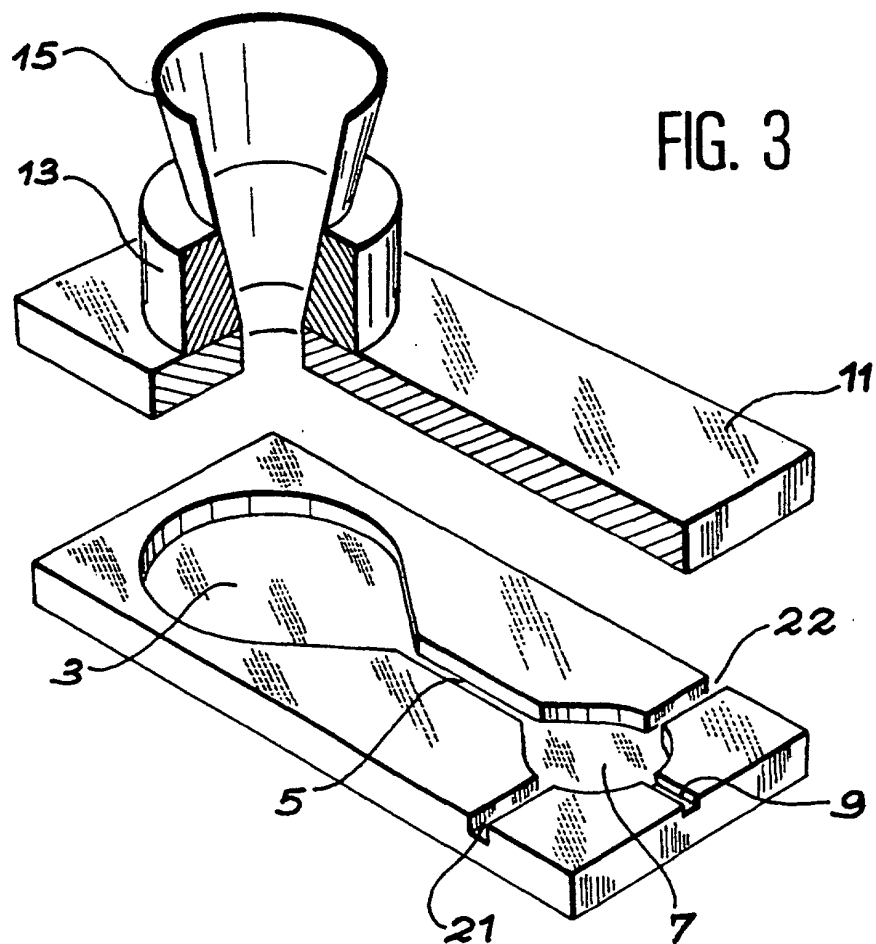


FIG. 3

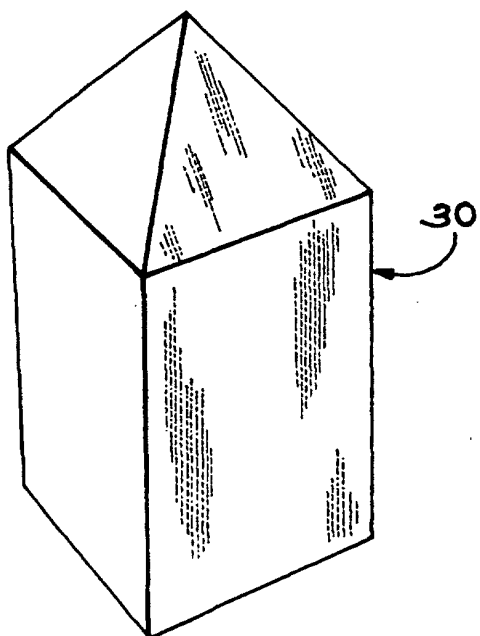


FIG. 4

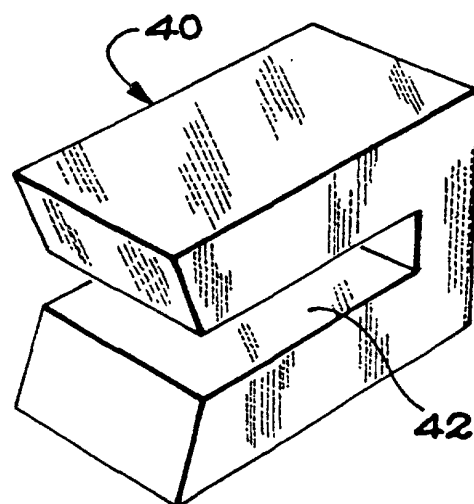


FIG. 5