

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
9 décembre 2004 (09.12.2004)

PCT

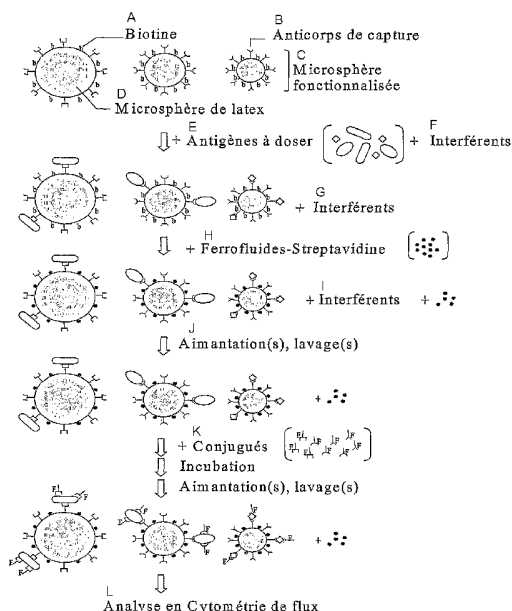
(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/106928 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : **G01N 33/543**
- (21) Numéro de la demande internationale : **PCT/FR2004/001307**
- (22) Date de dépôt international : **26 mai 2004 (26.05.2004)**
- (25) Langue de dépôt : **français**
- (26) Langue de publication : **français**
- (30) Données relatives à la priorité :
03.06354 26 mai 2003 (26.05.2003) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **BIOCY-TEX [FR/FR]; 140, chemin de l'Armée d'Afrique, F-13010 Marseille (FR).**
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **HAQUETTE, Guillaume [FR/FR]; 10, allée de la Caravelle, F-13127 Vitrolles (FR). PONCELET, Philippe [FR/FR]; 19, allée Albeniz, F-13008 Marseille (FR). MOULARD, Maxime [FR/FR]; 33, Le Bélvédère, F-13390 Auriol (FR). CANTON, Michel [FR/FR]; L'Orangerie, 92, rue Marius Aufran, F-92200 Levallois Perret (FR).**
- (74) Mandataires : **MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).**
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : **AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,**

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION AND MULTIPLEX QUANTIFICATION OF ANALYTES IN A SAMPLE, USING MICROSPHERES

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION MULTIPLEX D'ANALYSES DANS UN ECHANTILLON A L'AIDE DE MICROSPHERES



- A... BIOTIN
B... TRAPPING ANTIBODIES
C... FUNCTIONALISED MICROSPHERES
D... LATEX MICROSPHERE
E... ANTIGENS FOR DOSING
F, G, I... INTERFERENTS
H... FERROFLUIDS + STREPTAVIDIN
J... MAGNETISATION(S), WASHING(S)
K... + CONJUGATES, INCUBATION, MAGNETISATION(S), WASHING(S)
L... ANALYSIS BY FLOW CYTOMETRY

(57) Abstract: The invention relates to a method for the detection and multiplex quantification of analytes in a sample, using functionalised microspheres, whereby said microspheres are magnetised after the sample has been brought into contact therewith. The inventive method is particularly suitable for the detection and multiplex quantification of several analytes by means of flow cytometry. The invention also relates to a kit which is used for the detection and/or quantification of several analytes in order to carry out the inventive method, comprising a suspension of functionalised non-magnetic microspheres, a ferrofluid solution and a solution with at least one conjugate.

(57) Abrégé: L'invention a pour objet un procédé de détection et/ou de quantification multiplex d'analytes dans un échantillon à l'aide de microsphères fonctionnalisées, ces microsphères étant magnétisées après l'étape de mise en présence de l'échantillon avec ces microsphères. Le procédé de l'invention est particulièrement adapté à la détection et à la quantification multiplex de plusieurs analytes par cytométrie de flux. L'invention a également pour objet un kit pour la détection et/ou la quantification de plusieurs analytes pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention qui comprend une suspension de microsphères non magnétiques fonctionnalisées, une solution de ferrofluides et une solution d'au moins un conjugué.



CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**PROCEDE DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION MULTIPLEX D'ANALYTES
DANS UN ECHANTILLON A L'AIDE DE MICROSPHERES**

5

La présente invention concerne un procédé de détection et/ou de quantification multiplex d'analytes dans un échantillon à l'aide de microsphères fonctionnalisées, ces microsphères étant magnétisées après l'étape de mise en présence de l'échantillon avec ces microsphères. Le procédé de l'invention est particulièrement adapté à la détection et à la quantification multiplex de plusieurs analytes par cytométrie de flux. L'invention a également pour objet un kit pour la détection et/ou la quantification de plusieurs analytes pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention qui comprend une suspension de microsphères non magnétiques fonctionnalisées, une solution de ferrofluides et une solution d'au moins un conjugué.

15

Le développement et la diversification du diagnostic *in vitro* demandent de plus en plus la mise en place de moyens pour la détection et l'identification rapides de composés et microorganismes divers. Ce besoin concerne à la fois le domaine de la santé humaine ou animale, par exemple pour la recherche et le dosage d'antigènes ou agents pathogènes particuliers, le domaine de l'agro-alimentaire, tel par exemple le contrôle de la qualité et le dépistage de contaminants éventuels dans des produits destinés à l'alimentation, ou le domaine de l'environnement lorsqu'il s'agit par exemple de prévention de tout risque biologique, ou de détection d'impuretés, pesticides ou agents polluants divers.

25

L'utilisation de tests immunologiques sur microbilles associés à des systèmes d'analyse de type cytométrie de flux, constitue l'une des voies technologiques les mieux adaptées à ces besoins et de nombreuses approches basées sur ce principe ont été proposées dans l'état de l'art.

30

Par exemple, les demandes de brevet internationales publiées sous les numéros WO 98/51435, WO 94/09368, WO 90/15666 et la demande de brevet européenne publiée sous le numéro EP 180384 décrivent des particules magnétiques ou fluorescentes de type particulier, utilisables dans des méthodes de diagnostic.

D'autres documents de l'art antérieur proposent différents protocoles pour l'identification et/ou le dosage d'analytes multiples sur microbilles. Ainsi à titre d'exemple, la demande internationale publiée sous le numéro WO 90/05305 concerne un procédé et son kit correspondant pour détecter et/ou doser plusieurs analytes dans un échantillon par une méthode d'agglutination utilisant plusieurs sous-populations de billes fluorescentes. La fluorescence des agrégats formés peut être mesurée par cytométrie de flux, analyse d'image ou système à balayage laser.

Le brevet américain délivré sous le numéro US 4,665,020 concerne un procédé de dosage d'un antigène par cytométrie de flux utilisant deux populations de sphères de diamètre différent, les plus grosses étant recouvertes d'un anticorps spécifique de l'antigène, et les plus petites étant fluorescentes. Le dosage est réalisé selon le principe d'une méthode sandwich ou de compétition en fonction du ligand fixé sur les sphères fluorescentes (anticorps ou antigène).

La demande internationale publiée sous le numéro WO 97/14028 concerne une méthode d'analyse par cytométrie de flux pour la détection de plusieurs analytes d'intérêt, dans laquelle on utilise une pluralité de sous-populations de billes dont au moins l'un des paramètres de classification pour l'analyse en cytométrie de flux diffère d'une sous-population à l'autre. Chaque sous-population est couplée à un composé réagissant spécifiquement avec l'un des analytes à doser. La sous-population de billes, et donc la nature du composé ayant réagi avec l'analyte correspondant, est identifiée par cytométrie, à partir de l'analyse de l'ensemble des paramètres de classification de chaque sous-population.

La demande internationale publiée sous le numéro WO 98/20351 concerne une méthode pour déterminer la présence d'un ou plusieurs analytes dans un échantillon, dans laquelle on utilise des populations "test" de microparticules, chacune des populations portant un ligand spécifique d'un analyte, et des microparticules de référence ne réagissant avec aucun des analytes recherchés. Le dosage est réalisé en comptant le nombre de microparticules libres dans chaque population "test" et en le comparant à celui des microparticules de référence. Le comptage est réalisé selon différentes méthodes, dont préférentiellement la cytométrie.

La demande internationale publiée sous le numéro WO 96/31777 vise une méthode de détection de microorganismes dans un échantillon utilisant au moins un

type de particule détectable portant un ligand spécifique des microorganismes recherchés. Les microorganismes fixés aux particules sont ensuite révélés à l'aide d'un second ligand portant un marqueur fluorescent.

Le brevet américain délivré sous le numéro US 6,280,618 concerne une méthode
5 pour détecter individuellement une pluralité d'analytes dans laquelle on utilise un mélange de populations de microparticules magnétiques pouvant être différenciées les unes des autres et portant chacune un ligand différent. Les microparticules de chaque groupe sont séparées du milieu et mises ensuite en suspension dans un second milieu liquide dans lequel elles sont analysées par cytométrie de flux.

10 La demande internationale publiée sous le numéro W0 93/02260 concerne une méthode de cytométrie de flux pour détecter simultanément plusieurs analytes dans un même échantillon, et le réactif pour sa mise en œuvre. Ce réactif est constitué par un mélange de plusieurs sous-populations de microsphères, chaque sous-population portant à la surface un ligand particulier capable de former une paire de liaison spécifique avec
15 l'un des analytes recherchés. La détection des analytes fixés aux microsphères est réalisée après addition d'un agent portant un fluorochrome, capable de se fixer sur les paires de liaisons formées.

Ces procédés de détection simultanée de plusieurs analytes dans un même échantillon peuvent également comporter une ou plusieurs étapes de séparation
20 magnétique.

En effet, une telle étape de séparation magnétique permet de faciliter les dosages dans certains milieux complexes où les antigènes d'intérêt doivent être isolés de façon spécifique (une analyse cytométrique pouvant s'avérer non réalisable en présence de certaines microparticules). C'est le cas par exemple pour des analyses en agro-
25 alimentaire, papeterie et traitement des eaux usées où sont recherchées des molécules / particules présentes dans des broyats liquéfiés divers (pulpes, mous, produits laitiers voire fromagers, jus de fruits, broyats de légumes, jus de fermentation etc....), préparations qui ne peuvent être filtrées au risque de perdre l'analyte à doser.

C'est le cas aussi pour des analyses en sciences de l'environnement et santé
30 humaine où le contenu particulaire d'un grand volume d'air est concentré dans un liquide grâce à un bio-collecteur. Dans ce cas aussi il est impératif d'éliminer toutes les particules, poussières, micro-fibres, pollens etc... en suspension dans l'air, dont la taille

i) soit couvre celle des billes de capture (1 à 30 μm) et rend difficile voire impossible leur identification par les seuls paramètres de diffusion lumineuse, ii) soit rend incompatible l'analyse par bouchage du cytomètre (risque élevé à partir de 100 μm) et qui sont retrouvées concentrées dans le liquide après biocollection.

5 De plus, on doit aussi se débarrasser des particules huileuses (graisseuses) qui sont incompatibles avec le bon fonctionnement de la fluidique d'un cytomètre.

En outre, l'utilisation d'une séparation magnétique permet également de concentrer rapidement les agents à doser et évite de devoir utiliser des étapes de centrifugation pour laver les billes de capture.

10 Une telle association entre une étape de capture spécifique sur des microbilles et une étape de séparation magnétique a déjà été décrite dans l'état de l'art, notamment dans le brevet délivré sous le numéro US 6,280,618.

Toutefois, l'utilisation de microsphères magnétiques dans un procédé d'identification et de dosage d'analytes contenus dans un échantillon, peut présenter
15 différentes contraintes industrielles, et gêner la manipulation et l'homogénéité de prélèvement des suspensions. En effet, des microsphères magnétiques de tailles différentes (et souvent de contenus différents en matériel aimantable) peuvent avoir des comportements différents au cours de la séparation magnétique, c'est-à-dire des temps
20 selon les familles de microbilles en présence, d'où une hétérogénéité des résultats ou un allongement des phases de séparation magnétique. Pour pallier ce problème, il est nécessaire de disposer de microsphères magnétiques dont le contenu en matériel aimantable est adapté en fonction de la taille. Ceci crée bien évidemment des contraintes industrielles en terme de fabrication ou d'approvisionnement.

25 De plus, les microsphères magnétiques sont denses, ce qui pose des problèmes pratiques de sédimentation au stockage, remise en suspension et sédimentation rapide à l'analyse. En effet, la densité des billes magnétiques est couramment supérieure à 1,15 et, selon le taux de magnétite, oscille entre 1,15 et 1,50, amenant à des vitesses de sédimentation très rapides, en particulier pour des particules de grand diamètre ($> 2 \mu\text{m}$)
30 (cf. demande de brevet européen publiée sous le numéro EP 1248110).

Ainsi, il existe aujourd'hui un besoin de développer un nouveau procédé spécifique d'identification et de dosage de plusieurs analytes contenus dans un

échantillon liquide et qui comprend une ou plusieurs étapes de séparation magnétique, ledit procédé étant capable de contourner de tels inconvénients liés à l'utilisation de microsphères magnétiques.

Le brevet américain US 5,998,224 (publié le 7 décembre 1999, déposant :
5 ABBOTT LABORATORIES), a pour objet une méthode de détermination de la présence ou de la quantité d'un analyte dans un échantillon test.

Selon un premier mode de réalisation, cette méthode comprend la mise en contact de l'échantillon test avec une phase solide mobile et un réactif magnétique pour former un mélange réactionnel dans lequel ledit analyte se lie à ladite phase solide
10 mobile et ledit réactif magnétique pour former un complexe, puis à l'application d'un champ magnétique.

Selon un second mode de réalisation, la méthode comprend la mise en contact de l'analyte avec le réactif magnétique pour former un premier complexe, et la mise en contact du réactif magnétique avec la phase mobile solide pour former un second
15 complexe, suivi de l'application du champ magnétique.

Selon une alternative de ce second mode de réalisation, l'analyte se lie à la phase mobile pour former un premier complexe et le réactif magnétique se lie à la phase mobile pour former un second complexe, puis un champ magnétique est appliqué.

La demande de brevet américain, publiée le 27 décembre 2001 sous le numéro
20 US 2001/0054580 (BIO-RAD LABORATORIES, INC, liée à EP 1248110) a pour objet un test multiplex permettant de différencier plusieurs analytes dans un échantillon. Ce test met en œuvre des particules magnétiques en tant que phase solide et engendre un résultat individuel pour chaque analyte. Les particules magnétiques peuvent être distinguées entre elles par des caractéristiques qui permettent de les différencier en
25 groupes, chaque groupe portant un réactif lié à la surface de la particule qui est différent des réactifs présents sur les particules des autres groupes.

Dans ce test multiplex, l'échantillon contenant lesdits analytes est mis en présence de particules magnétiques.

La demande de brevet européen publiée le 5 août 1987 sous le numéro EP
30 230 768 (SYNTEX INC), a pour objet une méthode de séparation d'une substance d'un milieu liquide. Cette méthode met en œuvre des particules magnétiques ou non magnétiques.

Les particules non magnétiques peuvent être fonctionnalisées de manière à se lier à un membre d'une paire de liaison spécifique ou à une particule magnétique.

Un ferrofluide est décrit en tant que fluide magnétique, dans lequel les particules en suspension sont des particules ferromagnétiques. Les particules magnétiques colloïdales du fluide magnétique peuvent être cotées avec du matériel protéique tel que des protéines ferriques : albumine, gammaglobuline, etc.... Le « coating » des particules magnétiques avec des protéines peut être accompli par une liaison physique, par exemple l'absorption, ou une liaison chimique.

La présente a pour objet un procédé de détection et/ou de quantification multiplex d'analytes susceptibles d'être contenus dans un échantillon à l'aide de microsphères non magnétiques fonctionnalisées, lesdits analytes pouvant être le cas échéant préalablement marqués par un marqueur, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la mise en présence dudit échantillon avec une suspension de populations de microsphères non magnétiques fonctionnalisées, lesdites microsphères portant à leur surface :
 - pour toutes les populations de microsphères, un composé A formant un premier membre d'une paire de liaison, ledit composé A étant également caractérisé en ce qu'il ne peut pas se lier avec lesdits analytes, et
 - pour chacune des populations de microsphères, un composé B, différent pour chaque population, capable de former une paire de liaison spécifique avec l'un desdits analytes de l'échantillon,
- b) l'addition au milieu réactionnel obtenu à l'étape a) d'un ferrofluide, lequel ferrofluide contient des particules magnétiques qui portent à leur surface un second membre de liaison capable de former une paire de liaison spécifique avec le composé A,
- c) au moins une étape de lavage par séparation magnétique des microsphères magnétisées à l'étape b),
- d) le cas échéant lorsque lesdits analytes ne sont pas préalablement marqués, la mise en présence de la suspension des microsphères magnétisées obtenues à l'étape c) avec une solution d'au moins un conjugué, ledit conjugué

comprenant un composé C capable de reconnaître et de se lier spécifiquement avec l'un desdits analytes et un marqueur, cette étape d) étant suivie de préférence d'au moins une étape de lavage des microsphères par séparation magnétique, et,

- 5 e) la détection et/ou la quantification dudit marqueur à la surface des microsphères.

On entend désigner par procédé de détection et/ou de quantification multiplex dans la présente description un procédé de détection et/ou de quantification de plusieurs analytes d'intérêt en un seul test.

- 10 On entend désigner par échantillon dans le procédé selon la présente invention tout échantillon pouvant contenir plusieurs analytes que l'on souhaite détecter et/ou quantifier dans ledit échantillon.

Parmi les échantillons susceptibles de contenir lesdits analytes selon la présente invention, on peut citer notamment les échantillons biologiques (notamment sang total,
15 plasma ou sérum, liquide céphalorachidien, muqueuses, etc...) ou chimiques issus de tous types de prélèvements, notamment dans les domaines de la santé humaine ou animale, de l'agro-alimentaire ou de l'environnement, ou encore issus de l'industrie chimique, lesquels prélèvements sont effectués afin de détecter et/ou quantifier plusieurs analytes d'intérêt susceptibles d'être contenus dans ledit échantillon prélevé.

- 20 Par analyte, on entend désigner dans la présente description tout composé d'intérêt susceptible de pouvoir être détecté et/ou quantifié selon la présente invention.

De préférence, lesdits analytes sont de type protéique et dérivés, ou sont des acides nucléiques.

- 25 Les termes protéine, polypeptide ou peptide sont utilisés indifféremment dans la présente description pour désigner une séquence d'acides aminés ou, pour leurs dérivés, contenant une séquence d'acides aminés.

Par acide nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence nucléotidique, termes qui seront employés indifféremment dans la présente description, on entend désigner un
30 enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin que des

produits de transcription desdits ADN. Ces acides nucléiques sont isolés de leur environnement naturel, et sont naturels ou artificiels.

Selon un mode de réalisation particulier, de tels analytes sont des composés organiques, chimiques ou biochimiques, pouvant être présents soit en solution dans un liquide, soit présents à la surface d'une cellule ou d'une particule en suspension dans l'échantillon.

Comme exemple de cellule ou de particule pouvant porter à sa surface ledit analyte on peut citer, mais sans s'y limiter, les cellules eucaryotes telles qu'une cellule de mammifère ou une levure, les cellules procaryotes telles que par exemple une bactérie, et les particules telles que par exemple une particule virale, une spore ou un grain de pollen, ou tout micro-organisme, notamment un champignon.

Un premier mode de réalisation de l'invention concerne l'identification et/ou le dosage multiplex dans un échantillon d'agents biologiques tels que des antigènes liés à des supports, comme les antigènes de surface de microorganismes, les récepteurs et autres structures membranaires, ou des analytes à l'état libre dans l'échantillon, tels que des protéines, enzymes, métabolites, et autres produits de sécrétion.

Comme exemple d'analytes d'intérêt, on peut citer notamment, mais sans s'y limiter, les protéines et leurs dérivés tels que les glycoprotéines ou les lipoprotéines, les acides nucléiques, les hydrates de carbone, les composés de nature lipidique et tous les composés naturels ou pouvant être obtenus par synthèse chimique. On peut également citer comme exemples d'analytes les composés présentant une particularité fonctionnelle tels que les cytokines, les récepteurs cellulaires, les anticorps, les antigènes, les toxines, les allergènes, les drogues, les pesticides ou herbicides, ou tout polluant, analytes que l'on souhaite détecter et/ou quantifier dans un échantillon, qu'ils soient présents en solution ou le cas échéant portés à la surface d'une cellule ou d'une particule.

De manière particulièrement préférée, lesdits composés sont des toxines protéiques, ou bien ladite cellule ou particule est un microorganisme, tel qu'une bactérie ou un virus.

Lorsque les analytes sont présents à la surface d'une cellule ou d'une particule, la détection et/ou la quantification desdits analytes permet la détection et/ou la

quantification desdites cellules ou particules si lesdits analytes choisis sont spécifiques de ces dites cellules ou particules.

Comme autre exemple d'analytes d'intérêt pouvant être contenus dans un échantillon on peut citer les composés présents dans l'atmosphère, de façon naturelle ou
5 accidentelle, qui peuvent être collectés dans un liquide, tel que par exemple au moyen d'un biocollecteur, qui prélève les particules présentes dans l'atmosphère et les impacte dans un liquide, généralement un tampon tel que du PBS, ou une huile.

Un exemple typique de bio-collecteur est décrit dans la documentation commerciale du BioSampler® de SKC Inc., PA, ainsi que dans les brevets US 5902385
10 et US 5904752 et dans des publications techniques telles que: Buttner et al. : Sampling and analysis of airborne microorganisms, in Manual of environmental Microbiology, ASM Press, Wash.DC, 1997, pp. 629-640, Improved aerosol collection by combined impaction and centrifugal motion. Willeke K et al. , Aerosol Sci. Tech., 28:439-456 (1998) US 6468330 Irving et al.

15 On entend par analytes préalablement marqués par un marqueur dans le procédé selon l'invention tout analyte que l'on cherche à détecter et/ou quantifier dans un échantillon et qui se présente sous forme marquée avant la mise en œuvre dudit procédé.

Comme exemple d'analytes préalablement marqués on peut citer, mais sans s'y limiter, les acides nucléiques, ou produits PCR (amplicons), qui résultent d'une
20 amplification enzymatique, telle que la PCR (réaction en chaîne à la polymérase), qui peuvent être obtenus sous une forme marquée, notamment à l'aide de marqueurs fluorescents, ces techniques de marquage d'acides nucléiques étant bien connues de l'homme de l'art.

On entend désigner par microsphères non magnétiques fonctionnalisées dans le
25 procédé selon la présente invention des microsphères non magnétiques portant à leur surface un composé A et un composé B.

Les composés A et B peuvent être fixés sur les microsphères non magnétiques selon des méthodes connues de l'homme de l'art, telles que le couplage par liaison
30 covalente, par affinité, par adsorption passive ou forcée. De telles méthodes sont également utilisées pour la fixation du composé à la surface des particules magnétiques du ferrofluide.

De tels procédés de fonctionnalisation de divers supports ont été largement décrits dans la littérature, par exemple dans les brevets américains délivrés sous les numéros US 4,181,636 – US 4,264,766 – US 4,419,444 – US 4,775,619, etc. et dans Legastelois S et al., Latex et diagnostic. 1996, ou Le Technoscope . Biofutur, 161 :1-11;

5 Duke Scientific Corp. Catalog, Palo-Alto, CA. Technical Note-013A « Reagent Microspheres-Surface properties and Conjugation Methods ».

Dans le cas d'un couplage par liaison covalente, les microsphères utilisées sont porteuses de groupements chimiques capables de réagir avec un autre groupement chimique porté par le composé A ou B pour former une liaison covalente.

10 Comme exemple de groupements chimiques pouvant être présents à la surface des microsphères on peut citer, mais sans s'y limiter, les groupements carboxyle, amino, aldéhyde et époxy. Dans le cas particulier où les analytes que l'on cherche à caractériser sont des espèces chimiques réactives, un des groupements chimiques portés par les microsphères non magnétiques peut être capable de réagir spécifiquement avec les

15 espèces chimiques réactives desdits analytes que l'on cherche à détecter et/ou à quantifier, ledit groupement chimique assurant ainsi également le rôle du composé B.

Pour la fonctionnalisation des microsphères, on peut également utiliser l'interaction par affinité, qui est généralement mise en œuvre par deux partenaires d'un couple de liaison à haute affinité tels que notamment, mais sans s'y limiter, les couples

20 (poly) carbohydrate/lectine, biotine ou composés biotinilés/avidine ou streptavidine, récepteur /ligand spécifique, antigène ou haptène/anticorps, etc...

La fonctionnalisation des microsphères peut également être réalisée soit directement, soit en utilisant des bras espaceurs encore désignés sous les termes "linker" ou "spacer".

25 La fonctionnalisation par adsorption passive ou forcée est connue de l'homme de l'art, et a déjà été décrite dans les brevets américains précédemment cités. Pour la fonctionnalisation par adsorption passive on pourra utiliser par exemple la BSA-biotine (Bovin Serum Albumin) (Sigma, Lyon, FR - Réf. A-8549).

Les microsphères non magnétiques fonctionnalisées dans la présente description

30 peuvent être constituées par n'importe quel type de matériau dans la mesure où celui-ci ne contient aucun constituant magnétique. On choisira de préférence un matériau inerte aux analytes de l'échantillon et aux autres réactifs d'analyse, insoluble dans

l'échantillon et dans tous les autres milieux réactionnels utilisés dans le procédé selon l'invention et qui peut être fonctionnalisé. Il peut s'agir par exemple d'un polymère, ou d'un copolymère, ou encore de latex, de verre ou de silice.

Dans la mesure où ces microsphères ne sont pas magnétiques, il n'existe aucune
5 contrainte particulière quant au choix du matériau dans lequel elles peuvent être fabriquées. Ainsi, on peut utiliser n'importe quel type de microsphère dans une gamme très large de latex non magnétique. On peut également utiliser des microsphères dans d'autres matériaux, plus ou moins appropriés en fonction des analytes à détecter et/ou à quantifier, qui sont commercialisées dans diverses tailles sous forme non magnétique.
10 Ainsi, le procédé selon l'invention peut par exemple utiliser des microbilles de verre ou de silice, matériaux respectivement utilisés de préférence pour une capture de plaquettes sanguines et d'acides nucléiques (voir notamment la demande internationale publiée sous le numéro WO 94/19600 qui décrit l'utilisation de microbilles de verre pour capturer (et dans ce cas précis éliminer) des plaquettes agrégées activées).

15 On peut citer comme exemples de polymères ou de copolymères, mais sans s'y limiter, le divinylbenzène, le polystyrène, le polyvinylpyridine, les copolymères de styrène-butadiène, les copolymères d'acrylonitrile-butadiène, les polyesters, les copolymères d'acétate-acrylate ester de vinyl, les copolymères de chlorure-acrylate ester de vinyl, les polyéthers, les polyoléfines, les oxydes de polyalkylène, les
20 polyamides, les polyuréthanes, les polysaccharides, les celluloses, et les polyisoprènes. La réticulation est utile pour de nombreux polymères afin de donner une intégrité et une rigidité structurales auxdites microsphères.

Ainsi, selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé est caractérisé en ce que les microsphères sont dans un matériau choisi au sein du groupe
25 constitué par le latex, un polymère, un copolymère, le verre ou la silice.

Les microsphères non magnétiques en polymère ou copolymère, en latex, en verre ou en silice sont bien connues de l'homme de l'art et sont disponibles dans le commerce, comme par exemple les gammes de microsphères fournies par les sociétés
30 Spherotech (Libertyville, US), Polysciences (Warrington, US), Merck Eurolab SA (Fontenay-sous-Bois, FR) pour la gamme Estapor, Duke Scientific (Palo Alto, US), Seradyn (Indianapolis, US), Dynal Biotech pour Dyno Particles (Oslo, NO), etc.

D'autres gammes de microsphères pourront être fournies par Bang's Labs (Fishers, US) et Polymer Laboratories Ltd (Church Stretton, UK).

De même, des procédures d'adsorption / désorption d'acides nucléiques sur billes de silice sont décrites dans TechNote #302, Bang's Labs (Fishers, US) pour la
5 capture d'acides nucléiques.

Par ailleurs, grâce à l'étendue du choix du matériau des microsphères utilisables dans le procédé selon la présente invention, il est possible d'utiliser des microsphères qui sédimentent moins, par exemple des billes de latex non magnétiques, et qui sont donc plus faciles à utiliser, en particulier dans les automates.

10 Par composé A, on entend désigner dans la présente description, pour toutes les populations de microsphères, tout composé présent à la surface desdites microsphères non magnétiques fonctionnalisées telles que décrites précédemment, lequel composé est capable de se lier de manière spécifique avec un autre composé fixé à la surface des particules magnétiques d'un ferrofluide, ledit composé A formant le premier membre de
15 la paire de liaison spécifique, et l'autre composé formant le second membre, ledit composé A étant également caractérisé en ce qu'il ne peut pas se lier avec les analytes

On entend désigner par ferrofluide dans la présente description une suspension colloïdale stable de particules magnétiques dans un porteur liquide. Les particules magnétiques, qui ont une taille moyenne environ de 100 Å (10 nm), sont enduites d'un
20 agent de dispersion stabilisant (agent tensio-actif) qui empêche l'agglomération des particules même lorsqu'un gradient de champ magnétique fort est appliqué au ferrofluide. En l'absence d'un champ magnétique, les moments magnétiques des particules sont aléatoirement distribués et le fluide n'a aucune magnétisation nette.

Les particules magnétiques du ferrofluide sont recouvertes en surface par ledit
25 composé formant le second membre de la paire de liaison spécifique avec le composé A à la surface des microparticules. Ainsi, ces particules magnétiques sont capables de venir se fixer à la surface des microsphères grâce à ladite paire de liaison formée, lesdites microsphères étant de cette manière magnétisées.

Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé est caractérisé
30 en ce que ladite paire de liaison formée entre le composé A et le second membre fixé à la surface des ferrofluides, est de préférence choisie au sein du groupe constitué par les

paires de liaison spécifique de type biotine/avidine ou biotine/streptavidine, enzyme/cofacteur, lectine/carbohydrate et anticorps/haptène.

Comme exemple de ferrofluide, on peut citer notamment, mais sans s'y limiter le FF-SA (ferrofluides-streptavidine) de Molecular Probes Europe (Leiden, NL) (Réf. C-
5 21476, lot #71A1-1).

La quantité de matériel aimantable (particules magnétiques du ferrofluide) à mettre sur chaque population de microsphères peut donc être facilement gérée en modifiant la quantité des points d'accroche (formation des paires de liaisons) par population de microbilles.

10 De plus, la sédimentation des ferrofluides est aussi très limitée, ce qui facilite la manipulation et l'homogénéité de prélèvement des suspensions.

L'aimantation des microparticules est réalisée selon un protocole classique à l'aide d'un aimant (Ex. DYNAL MPC).

Par composé B, on entend désigner dans la présente description, pour chacune
15 des populations de microsphères, tout composé présent à la surface des microsphères de l'une des populations, lesquelles microsphères non magnétiques fonctionnalisées sont telles que décrites précédemment, lequel composé est capable de former une liaison spécifique avec l'un des analytes que l'on cherche à détecter et/ou à quantifier qui sont susceptibles d'être contenus dans l'échantillon.

20 Comme exemple de composé B on peut citer, mais sans toutefois s'y limiter, les protéines ou leurs fragments et structures dérivées, les récepteurs, les anticorps polyclonaux ou monoclonaux ou leurs fragments, les anticorps monovalents, les acides nucléiques mono ou double brin et tout fragment ou construction dérivée, ainsi que des associations de plusieurs de ces composants. On peut citer comme exemples de liaison
25 spécifique entre le composé B et un analyte le couplage antigène-anticorps ou ligand-récepteur membranaire, ou une hybridation entre acide nucléiques, la séquence nucléotidique du composé B greffé à la surface des microsphères étant alors complémentaire de celle de l'analyte.

De préférence, le composé B est une protéine ou l'un de ses fragments, capable
30 de reconnaître l'un desdits analytes, telle que par exemple un anticorps polyclonal ou monoclonal ou l'un de ses fragments, dirigé spécifiquement contre l'analyte que l'on cherche à détecter et/ou à quantifier, ou inversement, le composé B peut être un

antigène ou haptène capable de reconnaître un anticorps que l'on cherche à détecter et/ou à quantifier, ou encore un ligand spécifique d'un récepteur, un enzyme spécifique d'un cofacteur, ou un acide nucléique capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique que l'on cherche à détecter et/ou à quantifier.

- 5 Dans le cas où le composé B ou C est un anticorps, on pourra se référer, pour la préparation d'anticorps polyclonaux, monoclonaux, ou leurs fragments, ou encore recombinants, aux techniques bien connues de l'homme de l'art, techniques qui sont en particulier décrites dans le manuel « Antibodies » (Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications pp. 726, 1988) ou à la technique
- 10 de préparation à partir d'hybridomes décrite par Kohler et al. (Köhler et Milstein. Nature, 256: 495-497, 1975). Des anticorps spécifiques peuvent être obtenus par exemple à partir de sérum ou de cellule d'un animal immunisé spécifiquement contre des antigènes.

- Par fragment d'anticorps capable de reconnaître spécifiquement des antigènes,
- 15 on entend désigner en particulier les fragments d'anticorps comprenant tout fragment dudit anticorps capable de se fixer spécifiquement sur l'épitope dudit antigène sur lequel se fixe l'anticorps dont ledit fragment est issu. Des exemples de tels fragments incluent en particulier des anticorps simple chaîne (scFv) ou des fragments monovalents Fab ou Fab' et des fragments divalents tels que F(ab')₂, qui possèdent la même spécificité de
- 20 fixation que l'anticorps dont ils sont issus. Ces fragments d'anticorps peuvent être obtenus à partir des anticorps polyclonaux ou monoclonaux par des méthodes telles que la digestion par des enzymes, comme la pepsine ou la papaïne et/ou par clivage des ponts disulfures par réduction chimique. D'une autre manière ces anticorps, ou leurs fragments, pourront également être obtenus par recombinaison génétique (anticorps
- 25 recombinants).

Ainsi, selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé est caractérisé en ce que ledit composé B est choisi au sein du groupe constitué par les protéines et les acides nucléiques.

- Selon un mode particulier de réalisation, le composé B présent à la surface des
- 30 microsphères de chacune des populations est un anticorps et les analytes à détecter et/ou à quantifier sont des antigènes.

L'étape d) du procédé selon la présente invention est mise en œuvre uniquement dans le cas où lesdits analytes que l'on cherche à identifier et/ou à quantifier n'ont pas été préalablement marqués comme il a été décrit précédemment. Dans ce cas, ladite étape d) est nécessaire pour la réalisation de l'étape postérieure e) de détection et/ou de quantification. Elle fait intervenir une solution comprenant au moins un conjugué capable de se lier spécifiquement à l'un desdits analytes que l'on cherche à détecter et/ou à quantifier dans l'échantillon.

Ledit conjugué du procédé selon la présente invention comprend un composé C capable de reconnaître et de se lier spécifiquement avec l'un desdits analytes, et un marqueur qui lui est associé.

De manière préférée, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que le composé C dudit conjugué utilisé à l'étape d) est un composé choisi au sein du groupe constitué par les protéines et les acides nucléiques, lorsque lesdits analytes que l'on cherche à détecter et/ou à quantifier dans l'échantillon sont respectivement des protéines ou des acides nucléiques.

Lorsque l'étape d) du procédé selon l'invention est mise en œuvre, celle-ci est suivie de préférence d'au moins une étape de lavage par séparation magnétique, laquelle étape est nécessaire pour séparer les microsphères magnétisées marquées de celles portant à leur surface uniquement lesdits analytes.

L'étape e) du procédé selon la présente invention peut être réalisée selon toute méthode automatisée électronique ou optique de détection et de comptage de particules. La cytométrie de flux est particulièrement adaptée pour ce type d'analyse.

Cette méthode, largement utilisée aujourd'hui, permet de réaliser des mesures d'intensité lumineuse d'une très grande sensibilité sur des microsphères en suspension dans un milieu réactionnel. Ces mesures sont faites individuellement sur chaque microsphère, à haute cadence (plusieurs centaines à plusieurs milliers de microsphères analysées / interrogées par seconde), ce qui permet en quelques dizaines de secondes de réaliser ces mesures sur un grand nombre de microsphères. Plusieurs paramètres de lumière sont mesurables simultanément sur chacune des microsphères :

i) des paramètres de diffusion / diffraction de lumière laser pour en caractériser/évaluer la taille et la structure (granularité, compacité) d'une part et

- ii) d'autre part plusieurs paramètres de fluorescence, différentiables par leurs longueurs d'onde et généralement associés à la présence de fluorochromes, ou marqueurs fluorescents, présents intrinsèquement dans la microsphère, ou associés à la fixation spécifique de conjugués.

5 En pratique, la cytométrie en flux (CMF) consiste à faire défiler une à une devant un rayon laser focalisé les microsphères en suspension dans un liquide, et de mesurer, sur chaque microsphère, individuellement, d'une part la diffusion / diffraction de lumière laser et d'autre part les signaux de fluorescence associés. Toutes ces informations sont présentées à l'utilisateur sous forme de distributions de fréquences
10 (histogrammes) dans lesquelles ce dernier repère aisément des sous-populations homogènes sur un ou plusieurs des paramètres considérés (par exemple la taille ou une fluorescence). Un (ou plusieurs) paramètre(s) de fluorescence peu(ven)t servir, en plus des paramètres de taille/structure, au regroupement des individus appartenant à un même type de microsphères (dosage multiplex). Un (ou plusieurs) autre(s) paramètre(s)
15 de fluorescence peu(ven)t servir de révélateur, dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité d'analytes présent sur le type de microsphère considéré.

Un exemple de cytométrie de flux qui peut être utilisée à l'étape e) est la technique FACS (fluorescence-activated cell sorter), qui consiste en un système électronique pour séparer les microsphères selon leur taille et l'intensité de la
20 fluorescence qu'elles émettent après divers marquages. L'appareil prépare des microgouttes de la suspension de microsphères qui sont diluées de façon à ne contenir qu'une seule microsphère. La microgoutte passe devant un faisceau lumineux à rayon laser et les microsphères sont analysées (histogramme) et séparées sur la base de leur fluorescence et/ou de leur taille.

25 Parmi les marqueurs pouvant être utilisés pour le marquage du composé C ou pour le marquage desdits analytes que l'on cherche à détecter et/ou à quantifier dans l'échantillon, on préfère les marqueurs fluorescents tels que notamment, mais sans s'y limiter, la fluorescéine et ses dérivés, tels que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), ou encore l'allophycocyanine (APC), la phycoérythrine-cyanine 5 (PC5) et la
30 phycoérythrine (PE), la R-phycoérythrine (R-PE), ou encore la rhodamine et ses dérivés, la coumarine et ses dérivés, la luciférase et ses dérivés, la chromomycine, la mithramycine, la GFP (GFP pour « Green Fluorescent Protein »), la eGFP (eGFP pour

« Enhanced Green Fluorescent Protein »), la RFP (RFP pour « Red Fluorescent Protein »), la BFP (BFP pour « Blue Fluorescent Protein »), la eBFP (eBFP pour « Enhanced Blue Fluorescent Protein »), la YFP (YFP pour « Yellow Fluorescent Protein »), la eYFP (eYFP pour « Enhanced Yellow Fluorescent Protein ») le dansyl, l'umbelliférone, le bromure d'éthidium, l'acridine orange, le thiazole orange, le iodure de propidium (PI) etc.

Ainsi, de manière préférée, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que le ou les marqueurs utilisés sont fluorescents.

De manière plus préférée, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que la détection et/ou la quantification dudit marqueur à l'étape e) du procédé est réalisée par cytométrie de flux.

Les techniques permettant de coupler ces marqueurs sont bien connues de l'homme du métier et ne seront pas développées dans la présente description. Néanmoins, pour certains analytes, on peut trouver dans le commerce des conjugués comprenant de tels marqueurs fluorescents dirigés contre l'analyte que l'on cherche à détecter et/ou à quantifier.

Dans un tel procédé de détection et/ou de quantification multiplex de plusieurs analytes, on préfère utiliser une gamme de marqueurs pouvant être détectés et/ou quantifiés simultanément de manière spécifique, de préférence des marqueurs fluorescents. De manière particulièrement préférée, on utilisera la cytométrie de flux pour la détection et/ou la quantification directe et simultanée de ladite gamme de marqueurs fluorescents

Ainsi, la suspension de populations de microsphères pourra comprendre une première population n_1 dont les microsphères la composant auront chacune le composé B_1 fixé à leur surface, une deuxième population n_2 dont les microsphères la composant auront chacune le composé B_2 fixé à leur surface, une troisième population n_3 dont les microsphères la composant auront chacune le composé B_3 fixé à leur surface, et ainsi de suite. Ainsi, l'analyte₁ sera reconnu par le composé B_1 , l'analyte₂ sera reconnu par le composé B_2 , l'analyte₃ sera reconnu par le composé B_3 , et ainsi de suite.

Selon un mode particulier de réalisation, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que deux au moins desdites populations possèdent en outre au moins une caractéristique physique intrinsèque permettant de les différencier entre elles.

L'homme du métier peut disposer de populations de microsphères présentant des caractéristiques physiques intrinsèques permettant de les différencier les unes des autres, permettant ainsi d'augmenter le nombre d'analytes différents à détecter et/ou à quantifier dans un échantillon, lesdites caractéristiques physiques intrinsèques pouvant être
5 différenciables par leur taille et/ou leurs propriétés optiques (fluorescence spécifique pour chaque population).

Ainsi, de manière préférée, la caractéristique physique intrinsèque des microsphères du procédé selon la présente invention permettant de différencier les au moins deux populations de microsphères est la taille et/ou une propriété optique desdites
10 microsphères.

De manière plus préférée, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que les microsphères ont une taille comprise entre 0,3 et 100 μm .

De manière encore plus préférée, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que les microsphères ont une taille comprise entre 1 et 20 μm .

Ces gammes de taille correspondent le mieux au domaine d'analyse de taille des
15 cytomètres en flux courants. Dans ces gammes de diamètres et à condition de ne pas poser de contraintes supplémentaires trop rigides (magnétisme, fluorescence), il est facile de trouver des billes distinguables les unes des autres par leur seul paramètre de taille, mesuré par le paramètre nommé forward light scatter (FS ou FLS), pour former
20 plusieurs groupes distincts (ex. 1, 3, 5 ; 8 ; 10 et 15 μm). Certains de ces diamètres sont aussi disponibles en version fluorescente, voire avec plusieurs niveaux d'intensité différenciables.

Selon un autre mode de réalisation, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que la propriété optique est la longueur d'onde d'émission et/ou l'intensité de la
25 fluorescence desdites microsphères.

Ainsi, il est possible de différencier les n populations de microsphères de ladite suspension entre elles.

Ainsi par exemple, les gammes QuantumPlex™ fournies par Bang's Labs (Fishers, US) et CytoPlex™ fournies par Duke Scientific (Palo Alto, US) permettent
30 d'accéder, pour une taille donnée, à des sous-familles de billes différenciables par leur niveaux d'intensité en fluorescence rouge, jusqu'à 10 niveaux pour des billes de 4 μm (CytoPlex) ou 2 x 5 niveaux pour des billes de 4.4 et 5.5 μm (QuantumPlex). En

supposant disponibles les billes ad hoc dans les diamètres sus-cités et avec chacune 5 niveaux d'intensité de fluorescence rouge, la détection multiplex possible selon l'invention s'élève à $6 \times 5 = 30$ analytes.

Avantageusement, le procédé selon l'invention permet la détection et/ou la
5 quantification rapide d'au moins 6 analytes différents.

La spécificité requise pour les populations de conjugués utilisés est fonction de la complexité de l'étape e) de détection et/ou de quantification, du type et du nombre d'analytes recherchés. Il est ainsi possible de n'utiliser qu'une seule population de conjugué comprenant un seul type de marqueur, ledit conjugué ayant alors une fonction
10 de révélateur ubiquitaire. Dans ce cas, la spécificité est apportée uniquement par la sélectivité de chaque bille de capture. Inversement, il est également possible d'utiliser autant de populations de conjugués différentes que d'analytes à doser. En fonction du test à réaliser, l'homme du métier pourra bien entendu choisir les alternatives convenables entre ces deux variantes extrêmes.

15

Selon un mode de réalisation avantageux le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que lesdits analytes sont des acides nucléiques et en ce qu'à l'étape a), le composé B est un acide nucléique capable de s'hybrider spécifiquement avec l'un desdits analytes

20

De manière préférée, lesdits analytes sont des produits PCR.

De manière plus préférée, lesdits produits PCR sont obtenus marqués.

De tels produits PCR, le cas échéant marqués, ont été décrits précédemment. Les microsphères non magnétiques fonctionnalisées utilisées dans ce mode de réalisation portent à leur surface un composé B de type oligonucléotide, lequel composé B est
25 complémentaire de l'un des produits d'amplification recherchés. Lorsque les produits sont préalablement marqués, l'étape d) de mise en présence des microsphères magnétisées avec des conjugués n'est pas nécessaire. Le marquage à la surface des microsphères est fourni par le marqueur porté par les produits PCR que les microsphères ont capturé.

De manière encore plus préférée, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce
30 que le composé C dudit conjugué utilisé à l'étape d) est un acide nucléique capable de s'hybrider spécifiquement avec l'un desdits analytes.

Un tel type de conjugué pourra être utilisé par exemple pour détecter et/ou quantifier plusieurs analytes tels que notamment du matériel génomique non préalablement amplifié, ou des dérivés non préalablement amplifiés, tels que des fragments générés par clivage enzymatique à l'aide d'enzymes de restriction de ce matériel génomique.

L'étape d'amplification du signal peut être alors assurée par l'étape de ligation (ou ligature) entre le composé B des microsphères et le composé C des conjugués.

Ainsi, l'invention a également pour objet l'utilisation du procédé selon l'invention pour la détection et/ou la quantification multiplex de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms).

Dans ce cas, la méthode de l'invention est de préférence utilisée en association avec la technique OLA pour « Oligonucleotide Ligation Assay » (test de ligation d'oligonucléotides) basée sur l'action d'une ligase qui ne relie deux oligonucléotides adjacents d'une façon covalente qu'à la condition qu'ils soient parfaitement complémentaires du brin d'ADN matrice (Landegren et al Proc. Natl. Acad. Sci. US 1990;87:8923-8927; brevetUS4988617). Comme indiqué précédemment, le brin d'ADN matrice peut être soit un amplicon (fragment amplifié par PCR/Polymerase Chain Reaction ou autre réaction d'amplification enzymatique), soit du matériel génomique non préalablement amplifié ou ses dérivés non préalablement amplifiés par exemple des fragments générés par clivage enzymatique à l'aide d'enzymes de restriction de ce matériel génomique.

Ainsi, de manière préférée, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce la détection et/ou la quantification multiplex de SNPs est réalisée par la méthode OLA.

Dans cette variante, le conjugué au sens de la définition générale ci-dessus est une sonde de révélation (composé C) portant un marqueur fluorescent. L'étape de ligation constitue une étape supplémentaire entre l'étape d) et l'étape e) dudit procédé.

Le protocole décrit ci-après et schématisé sur la figure 1 illustre le principe général de l'invention. Ce mode de réalisation porte sur la détection de trois antigènes différents. Bien entendu, sur cette base, de nombreuses variantes pourront être envisagées par l'homme de l'art, selon la nature et le nombre d'analytes différents à détecter et/ou à quantifier, la sensibilité du test, la vitesse de réalisation, le matériel utilisé, etc. Ces

variantes peuvent par exemple concerner le nombre et/ou la taille et/ou les propriétés optiques des microsphères fonctionnalisées, le nombre de ligands spécifiques de l'analyte recherché fixé à leur surface (composés B), l'étape d'aimantation qui peut être répétée plusieurs fois en alternance avec des lavages successifs, la nature du marqueur lié au
5 conjugué qui peut être le même pour tous les conjugués du mélange ou être différent selon la spécificité des conjugués, etc.

Des populations de microsphères fonctionnalisées sont mises en présence de l'échantillon que l'on veut tester. Par mesure de simplification et de clarté, on considère dans ce descriptif que l'on dispose de trois populations de microsphères de latex (trois
10 analytes à détecter et/ou à quantifier) de tailles différentes. Chacune des populations porte à sa surface un composé B qui est un anticorps de capture spécifique de l'un des trois analytes recherchés. Dans cette illustration, on considère également que les composés A sont des molécules de biotine qui sont greffées à la surface des microsphères pour permettre la fixation des particules magnétiques du ferrofluide par l'intermédiaire d'une
15 liaison biotine-streptavidine. Lorsque les microsphères sont mélangées à l'échantillon, chacun des analytes recherchés va se lier à la population portant l'anticorps spécifique. Les particules magnétiques du ferrofluide couplés à de la streptavidine sont alors ajoutés au milieu et vont se fixer à la surface des microsphères. Les microsphères rendues ainsi magnétisables peuvent être séparées des autres produits interférents du milieu par une ou
20 plusieurs étapes d'aimantation en alternance avec une ou plusieurs étapes de lavage avec un tampon approprié.

Les populations de microsphères sont ensuite mises en présence d'un mélange de trois types de conjugués, chaque type de conjugué étant représenté dans ce schéma par un composé C qui est un anticorps spécifique portant un marqueur fluorescent.

25 Après une phase d'incubation des microsphères avec la solution de conjugués suffisante pour permettre la fixation desdits conjugués sur leur analyte spécifique, lui-même retenu à la surface des microsphères, les microsphères associées au fluorochrome, peuvent être analysées. Dans le cas présent, celles-ci sont analysées en cytométrie de flux en fonction de leur taille.

30 Les conjugués sont généralement utilisés en excès de façon à s'assurer un marquage optimal des analytes fixés sur les microsphères. De ce fait, avant de procéder à l'analyse des microsphères, il est préférable d'isoler celles-ci du milieu contenant des

conjugués en excès restés en suspension. Cette séparation est avantageusement réalisée à nouveau par une ou plusieurs série(s) d'aimantation et de lavage(s).

Comme cela a déjà été indiqué, une variante avantageuse du procédé selon
5 l'invention vise la détection et/ou la quantification de n acides nucléiques. Dans sa réalisation la plus simple, cette variante se déroule selon le protocole ci-après, schématisé dans la figure 2.

Dans ce cas, l'analyse porte sur trois produits de PCR fluorescents à l'aide de
billes de tailles différentes. Chacune des populations de microsphères fonctionnalisées est
10 recouverte par un composé B qui est un oligonucléotide complémentaire de l'un des produits de PCR (sonde de capture) et non plus par un anticorps spécifique. Les étapes de mélange et d'aimantation des microsphères sont identiques à celles décrites dans le mode de réalisation précédent. Après les étapes d'aimantation et de lavage, les microsphères
ayant capturé des produits fluorescents à leur surface sont analysées en cytométrie de
15 flux.

La présente invention a également pour objet un kit pour la détection et/ou la quantification multiplex d'analytes susceptibles d'être contenus dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend une suspension de populations de microsphères non magnétiques fonctionnalisées, lesdites microsphères portant à leur surface :

- 20 a) un réactif 1 comprenant une:
- un composé A formant un premier membre d'une paire de liaison ;
 - un composé B capable de former une liaison spécifique avec l'un desdits analytes de l'échantillon, et
- b) un réactif 2 comprenant un ferrofluide qui contient des particules
25 magnétiques portant à leur surface un second membre de liaison capable de former une paire de liaison spécifique avec ledit composé A ; et
- c) un réactif 3 comprenant une solution d'au moins un conjugué, ledit conjugué comprenant un composé C capable de réagir spécifiquement avec lesdits analytes et un marqueur capable d'être détecté.
- 30 De manière encore préférée, le kit selon l'invention comprend en outre :
- un réactif 4 comprenant lesdits analytes susceptibles d'être contenus dans un échantillon.

De manière encore plus préférée, le kit selon l'invention comprend en outre :

- un réactif 5 composé d'un tampon de dilution ; et
- un réactif 6 composé d'un tampon de lavage.

Enfin, selon un autre mode de réalisation encore plus préféré, le kit selon l'invention
5 comprend en outre :

- un réactif 7 comprenant un tampon de neutralisation de l'agrégation des différentes microsphères.

Lesdits tampons sont par exemple des tampons à base de PBS, tels que par exemple le PBS/Tween 20.

10 Le réactif 7 sera plus particulièrement utilisé dans le cas où le composé A à la surface des microsphères est un composé de type biotine. Ledit tampon de neutralisation permet d'éviter une agrégation des différentes microsphères recouvertes de composé A lors de l'aimantation. Dans ce cas où il s'agit de microsphères biotinylées, le tampon de neutralisation est par exemple constitué d'une solution aqueuse de biotine.

15 Comme cela a déjà été indiqué, et ainsi qu'il en ressortira à la lecture des exemples ci-après, la méthode de l'invention permet de réaliser en des temps relativement rapides l'identification simultanée de plusieurs agents dans un échantillon.

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinées à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

20

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du principe du procédé de détection et/ou de quantification (dosage multiplex) selon l'invention appliqué à la détection et/ou la quantification de trois
25 antigènes à l'aide de billes de tailles différentes.

Figure 2 : Schéma du principe du procédé selon l'invention appliqué au dosage multiplex de trois produits de PCR fluorescents à l'aide de billes de tailles différentes.

Figure 3 : Schéma du principe du procédé de dosage multiplex selon l'invention appliqué à la génétique moléculaire pour la recherche de SNPs.

30 **Figure 4 :** Schéma illustrant le même principe que le précédent, dans lequel un degré de spécificité supplémentaire est obtenu au niveau du greffage de la sonde de révélation.

Figures 5A, 5B, 5C : Analyse en CMF d'un mélange de billes de 3 - 8 -10 et 15 μm en fonction de la taille.

R1 : Estapor 3 μm + Polymer Laboratories 8 et 15 μm + Dynal Particles 10 μm ;

R2 et R6 : Estapor 3 μm ; R3 et R7 : Polymer Laboratories 8 μm ; R4 et R8 : Dynal

5 Particles 10 μm ; R5 et R9 : Polymer Laboratories 15 μm

Figures 6A, 6B, 6C et 6D : Analyse en CMF d'un mélange de billes de 3 - 4,4 - 8 -10 et 15 μm en fonction de la taille et d'une fluorescence.

R1 : Estapor 3 μm + Bangs QuantumPlex 4,4 μm + Polymer Laboratories 8 et 15 μm +

Dynal Particles 10 μm ; R2 et R6 : Estapor 3 μm + Bangs QuantumPlex 4,4 μm ; R3 et

10 R7 : Polymer Laboratories 8 μm ;

R4 et R8 : Dynal Particles 10 μm ; R5 et R9 : Polymer Laboratories 15 μm ; R10 :

Estapor 3 μm ; R11 : Bangs QuantumPlex #3 ; R12 : Bangs QuantumPlex #5 (R10, R11 et R12 sont contenues à l'intérieur de R2).

Figures 7A et 7B : Analyse en CMF d'un mélange de billes de 4,4 - 8 -10 et 15 μm initialement non magnétiques.

Figure 8 : Evolution de la distribution en FS LOG des différentes populations de billes-biotine lors de la fixation des FF-SA.

Figure 9 : Dosage de *B. globigii* sur microsphère 15 μm anti- *B. globigii*.

Figures 10A et 10B : Dosage d'Ovalbumine sur microsphère 4,4 μm QuantumPlex #3 anti-ovalbumine.

Figure 11 : Analyse CMF sur mélange duplex:

Les 2 types de billes sont distingués par leur taille en analyse double scatter , $\mu\text{S-FV}$ (diamètre 6,7 μm), conditionnées sur la région R1) et $\mu\text{S-FII}$ (diamètre 9,6 μm), conditionnées sur la région R2. Cette analyse sélective basée sur la taille est répétée

25 dans toutes les figures qui suivent.

Figures 12 et 13 : Analyse CMF sur mélange duplex d'un test doublement positif :

Les billes sont mises en présence des deux O.N. représentant les 2 gènes simultanément. La Fig 12 montre les niveaux de fluorescence en fonction de la taille, $\mu\text{S-FV}$ (région R4) et $\mu\text{S-FII}$ (région R3). La Fig 13 montre, en superposition, les histogrammes de

30 fluorescence verte respectifs de chaque type de billes, courbe pleine pour la bille $\mu\text{S-FV}$ et courbe vide pour la bille $\mu\text{S-FII}$. Les intensités moyennes de fluorescence verte (MFI) sont mesurées dans chacune des fenêtres M1 et M2.

Figures 14 et 15 : Analyse CMF sur mélange duplex ; contrôle négatif :

Les billes mises en présence des deux O.N. simultanément sont dés hybridées par la chaleur, montrant le marquage de bruit de fond non spécifique. La Fig 14 montre les niveaux de fluorescence en fonction de la taille, μ S-FV (région R4) et μ S-FII (région R3). La Fig 15 montre, en superposition, les histogrammes de fluorescence verte respectifs de chaque type de billes, courbe pleine pour la bille μ S-FV et courbe vide pour la bille μ S-FII. Les MFI sont mesurées dans chacune des fenêtres M1 et M2.

Figures 16 et 17 : Analyse CMF sur mélange duplex d'un test simple positif pour FV:

Les billes sont mises en présence d'un seul O.N., correspondant au FV . La Fig 16 montre les niveaux de fluorescence en fonction de la taille, μ S-FV (région R4) et μ S-FII (région R3). La Fig 17 montre, en superposition, les histogrammes de fluorescence verte respectifs de chaque type de billes, courbe pleine pour la bille μ S-FV et courbe vide pour la bille μ S-FII. Les MFI sont mesurées dans chacune des fenêtres M1 et M2.

Figures 18 et 19 : Analyse CMF sur mélange duplex d'un test simple positif pour FII:

Les billes sont mises en présence d'un seul O.N., correspondant au FII . La Fig 18 montre les niveaux de fluorescence en fonction de la taille, μ S-FV (région R4) et μ S-FII (région R3). La Fig 19 montre, en superposition, les histogrammes de fluorescence verte respectifs de chaque type de billes, courbe pleine pour la bille μ S-FV et courbe vide pour la bille μ S-FII. Les MFI sont mesurées dans chacune des fenêtres M1 et M2.

Figure 20 : La base critique (spécificité de SNP) est portée par chacune des sondes de révélation, spécifiques d'allèle et porteuses chacune d'un fluorochrome différent (ou d'un haptène/tag qui peut être révélé par un AcM anti-tag fluorescent). Ce système tire profit d'analyses multi-couleur réalisables en CMF. Chaque type de bille permet la détection différentielle d'une mutation.

Figure 21 : La base critique (spécificité de SNP) est portée par chacune des sondes de capture, spécifiques d'allèle, et couplée chacune à un type de bille différent (différenciés par exemple par la taille). Ce système ne réclame, pour l'analyse du signal en CMF, qu'une seule fluorescence permettant soit d'utiliser un appareillage plus simple et moins coûteux, soit de tirer parti d'autres couleurs pour différencier les familles de billes entre elles, dans des analyses multi-couleurs.

Figure 22 : Analyse CMF sur mélange duplex :

Les 2 types de billes sont distingués par leur taille en analyse double scatter , μ S-FVwt (diamètre 6,7 μ m, conditionnées sur la région R1) et μ S-FVmut (diamètre 9,6 μ m, conditionnées sur la région R2). Cette analyse sélective basée sur la taille (FS) et la granulométrie (SS) est répétée dans toutes les figures qui suivent.

Figures 23 et 24 : Analyse CMF sur mélange duplex d'un contrôle négatif :

Les billes sont mises en présence d'amplicons non spécifiques de la mutation étudiée qui servent de contrôle négatif en présence du mélange de PCR « Ampli-Mix ». La Fig 23 montre les niveaux de fluorescence en fonction de la taille, μ S-FVwt (région R4) et μ S-FVmut (région R3). La Fig 24 montre, en superposition, les histogrammes de fluorescence verte respectifs de chaque type de billes, courbe pleine pour la bille μ S-FVwt et courbe vide pour la bille μ S-Fvmut. Les intensités moyennes de fluorescence (MFI), mesurées dans les fenêtres M1 et M2, sont indiquées pour chaque type de billes.

Figures 25 à 28 : Analyse CMF sur mélange duplex d'un test simple positif sur allèle sauvage :

Les billes sont mises en présence d'amplicons d'un seul allèle (FVwt). La Fig 25 montre les niveaux de fluorescence en fonction de la taille, μ S-FVwt (région R4) et μ S-FVmut (région R3). La Fig 26 montre, en superposition, les histogrammes de fluorescence verte respectifs de chaque type de billes, courbe pleine pour la bille μ S-FVwt et courbe vide pour la bille μ S-Fvmut.

La Fig 27 montre, sur μ S-FVwt, les histogrammes du test (courbe à droite) et du BF (courbe à gauche, reprise de Fig 24).

La Fig 28 montre, sur μ S-FVmut les histogrammes du test (courbe à droite) et du BF (courbe à gauche, reprise de Fig 24).

Figures 29 à 32 : Analyse CMF sur mélange duplex d'un test simple positif sur allèle mutant :

Les billes sont mises en présence d'amplicons d'un seul allèle, ici le FV mut . La Fig 29 montre les niveaux de fluorescence en fonction de la taille, μ S-FVwt (région R4) et μ S-FVmut (région R3). La Fig 30 montre, en superposition, les histogrammes de fluorescence verte respectifs de chaque type de billes, courbe pleine pour la bille μ S-FVwt et courbe vide pour la bille μ S-Fvmut.

La Fig 31 montre, sur μ S-FVwt, les histogrammes du test (courbe à droite) et du BF (courbe à gauche, reprise de Fig 24).

La Fig 32 montre, sur μ S-FVmut les histogrammes du test (courbe à droite) et du BF (courbe à gauche, reprise de Fig 24).

5 **Figures 33 à 36 : Analyse CMF sur mélange duplex d'un test double positif :**

Les billes sont mises en présence d'amplicons des deux allèles simultanément. La Fig 33 montre les niveaux de fluorescence en fonction de la taille, μ S-FVwt (région R4) et μ S-FVmut (région R3). La Fig 34 montre, en superposition, les histogrammes de fluorescence verte respectifs de chaque type de billes, courbe pleine pour la bille μ S-

10 FVwt et courbe vide pour la bille μ S-FVmut.

La Fig 35 montre, sur μ S-FVwt, les histogrammes du test (courbe à droite) et du BF (courbe à gauche, reprise de Fig 24).

La Fig 36 montre, sur μ S-FVmut les histogrammes du test (courbe à droite) et du BF (courbe à gauche, reprise de Fig 24)

15 **Figure 37 :**

Dans la Fig. 37, comme dans la figure 21, la base critique (spécificité de SNP) est portée par chacune des sondes de capture, spécifiques d'allèle, et couplée chacune à un type de bille différent (différenciés par la taille). Ce système ne réclame, pour l'analyse du signal en CMF, qu'une analyse par comptage des billes sur la base des paramètres de

20 taille et de structure, permettant soit d'utiliser un appareillage dépourvu d'un détecteur de fluorescence et donc moins coûteux, soit de tirer parti d'autres tailles pour différencier les familles de billes entre elles.

Figure 38 : Analyse CMF sur mélange duplex :

Les 2 types de billes sont distingués par leur taille en analyse double scatter, μ S-FVwt (diamètre 6,7 μ m, conditionnées sur la région R1) et μ S-FVmut (diamètre 9,6 μ m, conditionnées sur la région R2). Cette analyse sélective basée sur la taille (FS) et la granulosité (SS) est répétée dans toutes les figures qui suivent.

25

Figures 39 et 40 : Analyse CMF sur mélange duplex d'un contrôle négatif :

Les billes sont mises en présence d'amplicons non spécifiques de la mutation étudiée qui servent de contrôle négatif en présence du mélange de PCR « Ampli-Mix ». La Fig 39 montre les niveaux du nombre de μ S en fonction de la taille, μ S-FVwt (région R1) et μ S-FVmut (région R2). La Fig 40 montre, en superposition, les histogrammes du

30

nombre de μ S respectifs de chaque type de billes. Les nombre de μ S, mesurées dans les fenêtres M1 et M2, sont indiquées pour chaque type de billes.

Figures 41 et 42 : Analyse CMF sur mélange duplex d'un test simple positif sur allèle sauvage :

- 5 Les billes sont mises en présence d'amplicons d'un seul allèle (FVwt). La Fig 41 montre les niveaux du nombre de μ S en fonction de la taille, μ S-FVwt (région R1) et μ S-FVmut (région R2). La Fig 42 montre, en superposition, les histogrammes du nombre de μ S respectifs de chaque type de billes. Les nombre de μ S, mesurées dans les fenêtres M1 et M2, sont indiquées pour chaque type de billes.

- 10 **Figures 43 et 44 :** Analyse CMF sur mélange duplex d'un test simple positif sur allèle mutant :

- Les billes sont mises en présence d'amplicons d'un seul allèle, ici le FVmut. La Fig 43 montre les niveaux du nombre de μ S en fonction de la taille, μ S-FVwt (région R1) et μ S-FVmut (région R2). La Fig 44 montre, en superposition, les histogrammes du nombre de μ S respectifs de chaque type de billes. Les nombre de μ S, mesurées dans les fenêtres M1 et M2, sont indiquées pour chaque type de billes.
- 15

EXEMPLES

- 20 **Exemple 1 : Reconnaissance de familles de microsphères (μ S) en fonction de la taille par CMF**

Les microsphères listées ci-dessous ont été mélangées dans des proportions similaires et le mélange analysé sur un cytomètre en flux de type EPICS XL (Coulter) (Figure 5).

- 25 • L'analyse par cytométrie en flux d'un mélange de 6 populations de billes de tailles 2 - 3,1 - 6 - 7,6 - 10,2 et 15,1 μ m a montré que les singlets des différentes populations de billes étaient différentiables en analyse double scatter. Les paramètres sont mesurés après amplification logarithmique (FS log/SS log) (FS pour Forward light Scatter ; SS pour Side light Scatter).

Liste des 6 populations de microsphères utilisées :

Référence	Fournisseur	Diamètre (μm)	Polymère
Dynospheres Calibration Kit	Dyno Particles (Dynal Biotech)	15,1	Polystyrène (PS)
Dynospheres Calibration Kit	Dyno Particles (Dynal Biotech)	10,2	PS
Uniform Latex Particles	Seradyn	7,6	PS 98% / Divinylbenzène (DVB) 2%
Sphero Polystyrene Particles	Spherotech, Inc.	6	PS
Microspheres Estapor White 3 μm	Estapor (Merck Eurolab)	3,1	PS
Dynospheres Calibration Kit	Dyno Particles (Dynal Biotech)	2	PS

- L'analyse par cytométrie en flux d'un mélange de 4 populations de billes de
- 5 tailles approximatives 3, 8, 10 et 15 μm a montré que les singlets des différentes populations de billes étaient aisément différenciables en FS log/SS log et que les multiplets éventuels ne représentaient pas une gêne.

Liste des 4 populations de microsphères utilisées :

Référence	N° de lot	Fournisseur	Diamètre (μm)	CV (%)	Polymère
PL-Microspheres Plain White 15 μm	SP-1444	Polymer Laboratories	14,57	2,92	Polystyrène (PS)
Dynospheres Q-561	Q-561	Dyno Particles (Dynal Biotech)	10,1	1,00	PS 94,5% /DVB 5,5 %
PL-Microspheres Plain White 8 μm	SP-1436	Polymer Laboratories	7,97	2,29	PS
Microspheres estapor White 3 μm R 94-52	285	Estapor (Merck Eurolab)	3,1	ND	PS

Voir figures 5A à 5C

5

Exemple 2 : Différenciation de multiples (6) familles de microsphères par CMF en fonction combinée de la taille et d'une fluorescence

Des microsphères de 4,4 μm porteuses d'une fluorescence rouge (mesurée sur le détecteur FL4 ont été ajoutées au mélange de l'exemple 1. La combinaison, au mélange précédemment décrit, de microsphères de 4,4 μm permet la reconnaissance de 2 familles supplémentaires ; la différence de scatter axial (log FS) entre les microsphères de 3 μm et celles de 4,4 μm reste trop faible pour une discrimination facile (cf. Fig 5 A et B). L'apport de la FL4 en paramètre associé permet une discrimination complète des microsphères de 4,4 μm vis-à-vis de toutes les autres (3 μm en particulier) et pour les 2 groupes de microsphères 4,4 μm entre eux (Figure 6).

15

Exemple 3 : Fonctionnalisation de microsphères 8, 10 et 15 μm par adsorption passive

Purification des IgG:

20

Des sérums polyclonaux de lapins immunisés contre les bactéries modèles *B. globigii*, *B. pseudomallei* ou *Y. pestis* ou contre les antigènes solubles modèles

ovalbumine (OVA) et chaîne A de la ricine (Ricine) ont été générés. Les Immunoglobulines G (IgG) de lapin ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur protéine G.

En bref, 50 ml de sérum dilué ont été déposés sur une colonne contenant 5 ml de protéine G Sepharose 4 fast flow (Pharmacia) préalablement équilibrée en tampon Na_2HPO_4 pH=7. Les IgG accrochées ont ensuite été éluées en tampon Glycine/HCl 0,1 M pH=2,7 puis immédiatement neutralisées par du tampon Tris/HCl pH=9.

Les éluats ont été dialysés contre du tampon PBS 150 mM pH=7,2 à 4°C puis concentrés par osmose inverse. Les concentrations en IgG ont été estimées par lecture d'absorbance à 280 nm ($\epsilon_{0,1\%}$ à 280 nm = 1,41).

Préparation des billes 8, 10 et 15 μm :

1 ml de billes de latex à 10% de solide (soit 100 mg de latex) de diamètres 8 μm (Polymer Laboratories), 10 μm (Dynal Particles) ou 15 μm (Polymer Laboratories), ont été centrifugés 10 mn à 500 g. Après élimination de 600 μl de surnageant, 2 ml de tampon PBS/Triton X-100 0,25%/NaN₃ 0,09% (PBS/Triton) ont été ajoutés. Les billes ont été incubées 10 mn à température ambiante, lavées par 2,4 ml de tampon PBS puis remises en suspension dans un volume final de 6 ml de ce même tampon et placées à 4°C pendant 30 mn.

Préparation des anticorps (Ac) :

Les Ac ont été dilués en tampon PBS à une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$ dans un volume de 1 ml et placés à 4°C pendant 30 mn. Deux tubes contenant 1 ml de PBS 150 mM / BSA 0,1 % / NaN₃ 0,09 % (PBS/BSA) ont également été prévus afin d'obtenir des billes non chargées.

La BSA-biotine (Sigma, Réf. A-8549) a été diluée en tampon PBS à 500 $\mu\text{g/ml}$ dans un volume de 1 ml et placée à 4°C pendant 30 mn.

Charge des billes :

1 ml de billes (8, 10 ou 15 μm) a été ajouté aux différentes solutions d'anticorps maintenues sous forte agitation (vortex). Les différents mélanges ont alors été placés 12 heures à 4°C sous agitation rotative. Après cette incubation, les mélanges ont été centrifugés 10 mn à 500 g. Après élimination du surnageant, les billes chargées ont été biotinylées par une incubation de 3 heures à 4°C dans 2 ml de BSA-biotine à 500 $\mu\text{g/ml}$. Après élimination du surnageant, les billes chargées ont été saturées par une incubation

de 2 heures dans 2 ml de tampon PBS/BSA 2 %. Deux lavages en tampon PBS ont été réalisés avant de reprendre les billes par 1 ml de PBS/BA. Les suspensions obtenues ont été numérotées et leurs concentrations ajustées à $2,5 \cdot 10^4/\mu\text{l}$.

5 Exemple 4 : Fonctionnalisation de microsphères 4,4 μm par couplage covalent

Les Ac anti-OVA et anti-Ricine ont été couplés de manière covalente après activation des billes -COOH (protocole adapté de la procédure Bang's Labs, Réf. TechNote #205 : "Covalent Coupling"). Le carbo-diimide utilisé pour l'activation des billes est le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide-HCl (EDC, Pierce – Brebières, FR -, Réf. 1853160).

Préparation des Ac :

Les IgG anti OVA (respectivement anti Ricine) ont été diluées en tampon PBS à une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$ dans un volume de 1 ml.

Activation des billes :

15 1 ml de billes de latex Bang's Labs QuantumPlex #5 et #3, diamètre 4,4 μm , ont été centrifugées 10 mn à 1900 g. Après élimination du surnageant, 2 ml de tampon MES 0,1 M pH=5,5 ont été ajoutés. Après répétition de cette opération, 500 μl de tampon MES 0,1 M/EDC 10 mg/ml pH=5,5 ont été ajoutés. Les mélanges ainsi obtenus ont été mis sous agitation rotative pendant 15 mn, lavés deux fois par 2 ml de tampon PBS puis
20 repris dans un volume de 1 ml de ce même tampon.

Couplage des Ac aux billes :

1 ml de billes QuantumPlex #5 a été ajouté à la solution d'IgG anti Ricine maintenue sous forte agitation (vortex). La même opération a été réalisée en mélangeant les billes QuantumPlex #3 à la solution d'IgG anti OVA précédemment préparée. Les
25 différents mélanges ont alors été placés 4h à température ambiante sous agitation rotative.

Biotinylation des billes :

Les mélanges ont été centrifugés 10 mn à 1900 g. Après élimination du surnageant, les billes chargées ont été biotinylées par une incubation d'une nuit à 4°C
30 dans 2 ml de PBS/BSA-biotine 0,05 %/Glycine 30 mM.

La charge des billes à la biotine a été vérifiée par la suite en CMF après marquage par de la Streptavidine-PE (Sigma, Réf. S-3402).

Saturation des billes :

Suite à cette incubation, les billes ont été centrifugées 10 mn à 1900 g. Après élimination du surnageant, les billes chargées ont été saturées par une incubation de 30 mn dans 2 ml de tampon PBS/BSA 2 %. Un lavage en tampon PBS a été réalisé avant de reprendre les billes par 1 ml de PBS/BA. Les suspensions obtenues ont été numérotées et leurs concentrations ajustées à $2,5 \cdot 10^4$ billes/ μ l.

Exemple 5 : Isolement magnétique et reconnaissance différentielle de microsphères 4,4 μ m, 8, 10 et 15 μ m initialement non magnétiques.

1. But

- Démontrer la possibilité d'isoler par aimantation des billes de latex, non magnétiques initialement, mais qui le deviennent lors de la fixation des particules magnétiques d'un ferrofluide par l'intermédiaire d'une liaison streptavidine/biotine.
- Montrer que cette fixation n'entraîne pas de recouvrement des différentes catégories de billes en FS LOG/SS LOG.
- Montrer que les rendements de récupération des billes sont suffisamment importants pour permettre une analyse cytométrique.

2. Matériel

- Mélange de billes fonctionnalisées (5000 billes/ μ l de chaque spécificité) composé de :
 - Billes 4,4 μ m QuantumPlex # 3 / Ac anti-OVA/ BSA-biotine (lot # 682).
 - Billes 4,4 μ m QuantumPlex # 5 / Ac anti-Ricine/ BSA-biotine (lot # 681).
 - Billes 8 μ m Polymer Laboratories / Ac anti *Y. pestis* / BSA-biotine (lot # 041).
 - Billes 10 μ m Dyno /Ac anti *B. pseudomallei* / BSA-biotine (lot # 042).
 - Billes 15 μ m Polymer Laboratories / Ac anti *B. globigii* / BSA-biotine (lot # 043).
- Ferrofluides-streptavidine (FF-SA) Molecular Probes (Réf. C-21476) à 0,5 mg Fe/ml (lot #71A1-1).
- d-biotine à 200 μ g/ml en eau distillée.

- Tampon PBS/Tween 0,1 %.
 - Tampon PBS/BA.
 - Tube IMS 1 ml.
 - Aimant Dynal.
- 5 - Billes 5,1 μ m Duke XPR green (lot # 1938).

3. Protocole

En tube IMS de 1 ml, introduire 790 μ l de PBS/Tween 0,1 % (tube IMS) ou 490 μ l de PBS/BSA 0,1%/NaN₃ 0,09% (PBS/BA) (tube référence).

- 10 Ajouter 10 μ l de mélange de billes fonctionnalisées (soit 50 000 billes de chaque catégorie).

Vortexer.

Pour le tube
IMS
uniquement

Ajouter 30 μ l de FF-SA.

Vortexer.

Mettre 5' sous agitation rotative.

Ajouter 100 μ l de biotine à 200 μ g/ml.

Incuber 1 min.

Vortexer.

Aimenter le tube pendant 2 min30.

Eliminer le tampon.

Ajouter 800 μ l de PBS/BA.

Aimenter le tube pendant 2min30.

Eliminer le tampon.

Ajouter 500 μ l de PBS/BA.

- 15 Ajouter 15 μ l de billes Duke XPR diluées au 1/50 en PBS/Tween 0,1 % (billes de référence permettant de standardiser le nombre d'évènements comptés lors de l'analyse cytométrique).

Analyser les deux tubes sur cytomètre Coulter EPICS XL comme indiqué ci-dessous :

Créer un histogramme FS LOG/SS LOG. Sur cet histogramme, créer 4 régions d'analyse (A, B, C et D) (Figure 7A).

Placer les régions B, C et D sur les billes de 8, 10 et 15 μm respectivement.

- 5 Placer la région A sur la population composée des billes de comptage (5,1 μm . Duke XPR) et des billes de capture de 4,4 μm .

Créer un histogramme FS LOG/FL4 LOG conditionné sur la fenêtre A (Figure 7b).

- 10 Créer 3 régions d'analyse (E, F et G).

Placer les régions E et F sur les populations de billes 4,4 μm QuantumPlex #3 et #5 respectivement. Placer la région G sur la population de billes de comptage (Duke XPR).

- 15 Créer un histogramme mono-paramétrique conditionné sur la région G. Placer un stop automatique d'analyse à 10 000 événements sur cet histogramme.

Relever le nombre d'événements comptés dans les régions B, C, D, E et F.

Calculer les rendements de récupération de chaque catégorie de billes en divisant le nombre d'événements comptés sur le tube IMS par celui compté sur le tube référence.

4. Résultats

- 20 **4.1. Evolution de la distribution en FS LOG des différentes populations de billes-biotine lors de la fixation des FF-SA (Figure 8).**

La fixation des FF-SA sur les billes/BSA-biotine entraîne une légère diminution du FS. Cette évolution n'entraîne pas de recouvrement des différentes populations de billes.

4.2. Rendements de récupération

Les rendements de récupération (% de billes récupérées) obtenus lors de 3 essais différents, dans les conditions exposées au paragraphe 3, sont exposés dans le tableau ci-dessous.

	Catégorie de billes/BSA-biotine				
	4,4 μm QP#3	4,4 μm QP#5	8 μm	10 μm	15 μm
Moyenne	52,3	50,5	69,3	93,3	90,8
Ecart-type	8,5	8,2	9,4	7,2	6,0
CV (%)	16,2	16,1	13,6	7,7	6,6

Des rendements de récupération compris entre 50 et 95 % ont été obtenus.

5. Conclusion

- 10 • La faisabilité de l'isolement par aimantation de billes de latex biotinylées rendues magnétiques par la fixation de FF-SA est acquise (rendements de récupération suffisants).
- Cette séparation magnétique est compatible avec la mise en œuvre d'un dosage multiplex (pas de recouvrement des différentes catégories de microsphères).
- 15 • Cet exemple illustre parfaitement la flexibilité du système.

L'utilisation disjointe de microsphères de multiplexage et de nanosphères de séparation élargit le champ de disponibilité des microsphères de qualités requises (taille, auto-fluorescence, densité, matériau, chimie de surface...). En effet les latex non magnétiques sont très facilement accessibles dans toutes les gammes des caractéristiques pré-citées, alors que la gamme de microsphères magnétiques est très réduite (< 1% des références catalogues). Le choix peut imposer par exemple des fournisseurs différents pour créer une série de familles de multiplexage significative ou des réalisations spéciales (et donc coûteuses).

Au contraire, avec le système proposé, on peut utiliser n'importe quelle microsphère de multiplexage, dans la gamme très large des latex non magnétiques.

Exemple 6 : Exemple de modèle de kit selon l'invention

- 5 Réactif 1 - Microsphères fonctionnalisées : mélange de microsphères biotinylées et coatées par des Ac spécifiques des Ag à doser. Concentration en billes : 2500 microsphères de chaque spécificité/ μ l (Tableau suivant).

Diamètre (μ m)	Fluorescence à 675 nm	Fournisseur	Référence	Ac de capture
15	-	Polymer Laboratories	PL-Microspheres Plain White 15 μ m	AcP anti- <i>B. globigii</i>
10	-	Dynal Particles	Dynospheres	AcP anti <i>B. pseudomallei</i>
8	-	Polymer Laboratories	PL-Microspheres Plain White 8 μ m	AcP anti- <i>Y. pestis</i>
4,4	+++	Bang's Lab.	QuantumPlex #5	AcP anti Ricine
4,4	++		QuantumPlex #4	AcM1 anti-SEB
4,4	+		QuantumPlex #3	AcP anti-Ova

- 10 Réactif 2 - Ferrofluides-Streptavidine : streptavidin, captivate ferrofluid conjugué (Molecular Probes, Réf. C-21476).

Réactif 3 - Réactif de révélation : mélange de conjugués fluorescents spécifiques des Ag à doser (Tableau suivant).

<i>Ac de révélation</i>	Fluorochrome conjugué	Concentration d'utilisation ($\mu\text{g/ml}$)
AcP anti- <i>B. globigii</i>	R-Phycoérythrine (R-PE)	25
AcP anti <i>B. pseudomallei</i>	Isothiocyanate de fluorescéine (FITC)	50
AcP anti- <i>Y. pestis</i>	R-PE	50
AcP anti Ricine	FITC	50
AcM2 anti-SEB	FITC	50
AcP anti-Ova	FITC	50

5

Réactif 4 - Standards : mélange concentré (concentration à définir) des 6 Ag à doser.

Une série de dilutions de ce réactif est à préparer extemporanément (dilution en Réactif 1). Traitée dans les mêmes conditions que l'échantillon à analyser, cette gamme
10 (nombre de points à déterminer) permet la quantification des Ag présents dans l'échantillon.

Réactif 5 - Tampon de dilution : tampon PBS/Tween20 0,1% pH=7,2.

Réactif 6 - Tampon de lavage : A déterminer (PBS/BSA 0,1%/NaN₃ 0,09% ou PBS/Tween 20 0,1% ou autre).

15

Réactif 7 - Tampon de neutralisation : solution de d-biotine à 200 $\mu\text{g/ml}$ en eau distillée.

20

La d-biotine empêche l'agrégation des différentes microsphères biotinylées lors de l'aimantation (agrégation microsphères/biotine – SA/FF/SA – biotine/microsphères évitée en neutralisant SA/FF/SA par de la biotine pour donner biotine-SA/FF/SA-biotine qui ne peut pas réaliser de pontage entre les différentes microsphères-biotine).

Matériel nécessaire non fourni : Aimant Dynal MPC

Exemple 7 : Modèle de protocole opératoire du dosage multiplex de 3 bactéries et 3 protéines

1. Préparer une gamme d'étalonnage en mélangeant les réactifs 4 et 5 comme indiqué ci-dessous

5

Tube		T0	T1	T2	T3	...	Tn
Réactif 4 (µl)							
Réactif 5 (µl)							
Concentration	Ag bactérien (bactéries/ml)						
	Ag protéique (ng/ml)						

2. En tubes de 1 ml, introduire 800 µl d'échantillon à analyser ou 800 µl de standard (tube T0 à Tn).

3. Ajouter 20 µl de réactif 1.

10

4. Vortexer les tubes.

5. Placer les tubes 8 minutes sous agitation rotative (possibilité de réduire ce temps à 5 minutes à l'étude).

6. Ajouter 30 µl de réactif 2.

7. Vortexer les tubes.

15

8. Placer les tubes 5 minutes sous agitation rotative.

9. Introduire 100 µl de réactif 7.

10. Vortexer les tubes.

11. Incuber 1 minute à température ambiante (cette incubation d'1 minute n'est pas forcément nécessaire)

20

12. Placer les tubes sur l'aimant pendant 2 minutes 30 secondes (possibilité de réduire ce temps à 2 minutes à l'étude).

13. Eliminer le milieu.

14. Ajouter 200 µl de réactif 3.

15. Vortexer les tubes.
16. Incuber 10 minutes à température ambiante.
17. Ajouter 600 µl de réactif 6.
18. Placer les tubes sur l'aimant pendant 2 minutes 30 secondes (possibilité de
5 réduire ce temps à 2 minutes à l'étude).
19. Eliminer le milieu.
20. Ajouter 500 µl de réactif 6.
21. Analyser en CMF.

10 **Exemple 8 : Détection et dosage d'une bactérie sur microsphères 15 µm après isolement magnétique.**

But : Détecter et déterminer la concentration en *B. globigii* sur billes 15 µm biotinylées et chargées par des AcP anti *B. globigii*.

Matériel et protocole : Ceux-ci correspondent aux exemples 6 et 7.

15 Echantillons analysés : dilutions de spores de *B. globigii* en réactif 1.
Concentrations en Ag de 160 000 - 80 000 - 40 000 - 20 000 - 10 000 et 5 000 spores/ml.

Résultats :

Spores/ml	MFI (a.u.)	FL2 MFI corrigée (a.u.)
160000	17,300	17,001
80000	7,760	7,461
40000	3,930	3,631
20000	2,110	1,811
10000	0,923	0,624
5000	0,463	0,164
0	0,299	0

Exemple 9 : Dosage multiplex d'ovalbumine sur microsphères 4,4 µm fluorescentes après isolement magnétique.

But : Détecter et déterminer la concentration en ovalbumine sur billes 4,4 µm fluorescentes biotinylées et chargés par des AcP anti Ovalbumine.

Matériel et Protocole : le matériel et le protocole employés sont décrits dans les exemples 6 et 7.

Echantillons analysés : dilutions d'Ovalbumine en réactif 1. Concentration en Ovalbumine de 1,6 - 0,8 - 0,4 - 0,2 - 0,1 et 0,05 ng/ml.

10 Résultats :

Ovalbumine (ng/ml)	MFI (a.u.)	FL1 corrigée (a.u.)
1,60	4,940	4,76
0,80	2,670	2,49
0,40	1,400	1,22
0,20	0,893	0,72
0,10	0,483	0,31
0,05	0,269	0,09
0	0,177	0

Exemple 10 : Analyse multiplex par cytométrie en flux appliquée à la génétique moléculaire pour la recherche de SNPs

Test type OLA

15 1) Une sonde oligonucléotidique de capture, d'une taille comprise généralement entre 5 et 100 bases, spécifique pour un gène, est fixée par les méthodes chimiques sur une microsphère de latex biotinylée (Iannone MA et al 2000; Cytometry 39:131-140). L'étape de biotinylation de la microsphère de latex peut aussi être réalisée après le couplage de la sonde de capture sur la microsphère. Dans un tube unique, les billes de latex sont incubées en présence des ferrofluides streptavidine (FF-SA), des sondes de
20 révélation (A1 et A2 dans l'exemple de la Figure 3) et des amplicons ou de l'ADN génomique extrait d'un échantillon biologique non amplifié préalablement par PCR ou des fragments dérivés de cet ADN non amplifiés préalablement par PCR. Les sondes A1

et A2 peuvent être soit des sondes fluorescentes différentes (par exemple Cy3 et Cy5) ou des haptènes distincts permettant une réaction immunologique ultérieure (par exemple avec deux anticorps marqués par des fluorochromes dissemblables [FITC vs PE]). Le multiplexage est obtenu par déclinaison du système de billes de latex qui
5 peuvent être soit de tailles variables ou/et douées de caractéristiques de fluorescence distinctes.

2) Avec le même principe que celui énoncé dans 1), un test peut être développé en ajoutant un degré de spécificité supplémentaire au niveau du greffage de la sonde de capture sur la microsphère de latex. Ce greffage peut être réalisé par l'intermédiaire d'un
10 couple antigène-anticorps spécifique, d'un couple haptène-anticorps spécifique ou d'une sonde oligonucléotidique riche en G+C (Guanine, Cytosine). Dans ce troisième cas, une séquence oligonucléotidique riche en G+C fixée de manière covalente à la microsphère s'hybride avec une séquence complémentaire ajoutée en 5' de la sonde de capture (Figure 4). De plus dans le cas de l'hybridation nucléotidique, le T_m (Melting
15 Temperature) de la séquence nucléotidique d'ancrage sera idéalement supérieur à 60°C et/ou composé d'un polymère d'au moins 15 résidus de guanine ou de cytosine ou d'un mélange des deux bases nucléotidiques. Dans ces conditions, les hybridations et déshybridations (réalisées généralement entre 15°C et 40°C) du matériel génomique ou des amplicons capturés sont possibles sans pour autant déshybrider la sonde capture de
20 la microsphère.

Exemple 11 : Détection différentielle de fragments de PCR marqués

1. Matériel

Dans certaines approches de réalisation de la PCR, les produits de PCR sont
25 rendus fluorescents à l'aide de nucléotides marqués. L'approche technique proposée par l'invention, qui met en œuvre des étapes de lavage par séparation magnétique de billes non magnétiques à l'origine, pourrait s'appliquer à la détection différentielle de produits de PCR marqués, selon le principe schématisé dans les Figures 11 et 19 et qui porte sur 3 spécificités différentes.

30 La faisabilité de l'analyse Multiplex en CMF après lavage des microsphères (μ S) par des ferrofluides est illustrée dans l'exemple ci-dessous et porte sur 2 spécificités différentes. Les produits de PCR marqués sont ici modélisés à l'aide

d'oligonucléotides (O.N.) marqués par la fluorescéine dont les séquences sont complémentaires à celles des sondes de captures respectives, préalablement couplées à la surface des billes. En pratique :

- les billes de diamètre 6,7 μm (Sphero™ Carboxyl-polystyrene particles, CP-60-10, Spherotech, Libertyville, IL) portent une sonde de capture Facteur V construite selon la structure ci-dessous, indiquée de l'extrémité 5' vers 3' :

$\mu\text{S-FV}$: NH_2 (C_6) TTT TTT TTT TTT ggA cAA AAT Acc TgT ATT ccT c (SEQ ID N°1)

- les billes de diamètre 9,6 μm (PL-Microspheres SuperCarboxyl White 10 μm , Polymer Laboratories, UK) portent une sonde de capture Facteur II construite selon la structure ci-dessous :

$\mu\text{S-FII}$: NH_2 (C_6) TTT TTT TTT TTT aat agc act ggg agc att gag gct c (SEQ ID N°2)

Les 2 sondes de capture sont construites avec un groupement aminé ($-\text{NH}_2$) en 5', en vue d'un couplage covalent sur des billes carboxylées ($\mu\text{S-COOH}$). Elles contiennent un bras d'entretoise (ou espaceur pour le terme anglais «spacer») formé de 6 carbones (C_6) et de 12 thymidines (T). Tous les oligonucléotides cités ont été synthétisés spécialement par Proligo (Paris, F).

- Le groupement biotine à la surface des billes, nécessaire au système de l'invention dans les exemples qui suivent, est apporté à l'aide d'un oligonucléotide poly-(T)₃₀ (noté polyT-biot), marqué en -3' par la biotine et porteur en -5' d'une entretoise NH_2 (C_6). Il est construit selon la structure ci-dessous :

NH_2 (C_6) TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-biotine (SEQ ID N° 3)

et couplé de la même façon et simultanément avec chaque sonde de capture.

- Les oligonucléotides complémentaires aux sondes de capture sont construits selon les structures ci-dessous et sont marqués par la fluorescéine (Fluor-) en -5' :

pour FV : Fluor-g Agg AAT AcA ggT ATT TTg Tcc (SEQ ID N°4)

pour FII : Fluor-g agc ctc aat gct ccc agt gct att (SEQ ID N°5)

Le couplage des sondes de capture sur les billes carboxylées de diamètre correspondant est réalisé après activation par l'EDAC (N-(diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide HCl, Sigma) comme suit :

Pour chaque type de bille, 10 millions de billes sont lavées en tampon PBS par centrifugation et adaptées à une concentration de 5×10^6 μ S/ml. L'activation des billes est réalisée en ajoutant 0,8mg d'EDAC (80 μ l à 10 mg/ml) et en incubant pendant 30 min. Les sondes sont ensuite mises en présence des billes activées. Afin de réaliser simultanément le couplage de la sonde spécifique et de la sonde porteuse de biotine, un mélange équimolaire d'oligonucléotide de capture et de sonde polyT-biot est mis en contact avec les billes activées (à 17 nmoles/ml en final soit ~ 250 pmoles de chaque O.N. au total)

Les billes sont incubées avec agitation intermittente (vortex) pendant 2 heures à TA (température ambiante) en tube de verre. Après le couplage, les groupements carboxyles activés sont neutralisés en ajoutant 400 μ l d'éthanolamine 0,2M, et en incubant pendant 16 h à 4°C.

Enfin, les sites d'interaction hydrophobe des billes sont aussi saturés par incubation 1/2h sous agitation en PBS-BSA 2%.

Pour les essais d'hybridation des O.N. sur billes décrits ci-après, les tampons sont les mêmes que ceux utilisés dans l'exemple suivant (exemple 12), où la détection concerne effectivement des ADN doubles brins. Ces tampons de pH optimaux, astringents ou non et permettant respectivement i) la déshybridation d'amplicons appariés et ii) la neutralisation dans des conditions favorables à une réhybridation au moins partielle (§) (cf. note de la partie 2 (matériel) de l'exemple 12) sur les sondes de capture immobilisées, sont tous issus de la trousse GENECOLOR™ FV Leiden (BioCytex, Marseille, F) , sous les dénominations respectives de « Hybridization buffer » / tampon d'hybridation, « Ligation buffer »/ noté ici tampon de neutralisation .

Le tampon de lavage/dilution pour analyse en cytométrie de flux est du PBS-Tween 20® 0,1%

(§) cf. note dans exemple suivant. (cf. note de la partie 2 (matériel) de l'exemple 12)

2. Méthode

Les billes (5 µl test soit 100 000 µS/test pour chaque type) et l'oligonucléotide (O.N.) complémentaire (5 µl soit 3 pmoles/test pour chacun des O.N. pour les doses maximales ou dilution au 1/10 selon indications) sont incubées en tubes PCR (Simport, Québec, C) pendant 15 min à TA en tampon d'hybridation puis 15 min à TA en tampon de neutralisation pour obtenir l'hybridation des brins complémentaires. Après l'hybridation, les O.N. non fixés aux billes sont lavés par séparation magnétique. Pour cela, on ajoute au mélange réactionnel 10 µl de Captivate™, ferrofluides chargés de Streptavidine (notés SA-FF, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), on incube 10 min, on transfère le contenu du tube PCR dans un tube pour CMF, on ajoute 1 ml de tampon de lavage (PBS-Tween20® 0,1%), et on place les tubes contre un aimant puissant (MPC-L, Dynal F, Compiègne, F) durant 5 min. Les billes aimantées restant collées contre la paroi du tube, on élimine la phase liquide et on resuspend les billes dans 2 ml de tampon de lavage pour la phase suivante (déshybridation sélective).

15

Pour la déshybridation sélective, les tubes sont chauffés à proximité du point de fusion (T_m) des sondes pour ne maintenir que les hybridations spécifiques (correspondant à la complémentarité totale des séquences i.e. 100%) et dissocier les hybridations non spécifiques (correspondant à des complémentarités partielles des séquences i.e. < 35 %). Pour cela, les tubes sont incubés à 54 °C en tampon PBS/Tween20® 0,1%, condition qui permet le décrochage sélectif des sondes fluorescentes FV et FII de leur séquence non complémentaire, « FII » et « FV » respectivement. Les tubes sont maintenus dans le bain-marie pendant 5 min à la température indiquée puis immédiatement analysés en CMF.

25

Pour la déshybridation complète, les tubes sont chauffés bien au-delà du point de fusion (T_m), en pratique pendant 10 min à 80°C.

3. Résultats

Les figures 11 à 19 illustrent la détection différentielle des fragments oligonucléotidiques marqués représentatifs des gènes de FV et FII respectivement, dans des analyses cytométriques duplex.

30

Dans tous les cas, les billes de capture de spécificité FV (μ S-FV) et de diamètre 6,7 μ m sont repérées dans la région R1 pour analyse de leur fluorescence. Les billes de capture de spécificité FII (μ S-FII) et de diamètre 9,6 μ m sont repérées dans la région R2.

5

a) En présence simultanément des 2 oligonucléotides marqués, un marquage maximum de chaque type de bille est observé (Fig. 12 et 13), correspondant à des intensités moyennes maximales de respectivement :

- 831 unités arbitraires (u.a.) pour μ S-FV
- 247 unités arbitraires (u.a.) pour μ S-FII

10

b) Lorsque les mêmes billes sont soumises à une déshybridation totale par chauffage 10 min à 80°C (Fig. 14 et 15), un marquage minimum de chaque type de bille est observé (Fig. 14 et 15), correspondant à des intensités moyennes minimales de :

- 6 u.a. pour μ S-FV
- 18 u.a. pour μ S-FII

15

Ces résultats correspondent donc à 2 gammes de travail d'amplitudes maximales de, respectivement :

- 6 à 840 u.a (μ S-FV)
- 18 à 250 u.a (μ S-FII)

20

c) En présence d'une dose réduite (1/10 de la dose maxi) d'un seul des 2 oligonucléotides marqués (FV), un marquage fort est observé sur μ S-FV (Fig. 16 et 17 ; 266 u.a. soit ~25% de l'amplitude maximale possible) alors que pour μ S-FII le signal reste proche du BF de 18 u.a. vu en fig. 15. (21 u.a. soit < 2% de l'amplitude maximale possible).

25

d) En sens inverse, en présence d'une dose réduite (1/10 de la dose maxi) d'un seul des 2 oligonucléotides marqués (FII), un marquage positif est observé sur μ S-FII (77 u.a. soit ~30% de l'amplitude maximale possible) alors que pour μ S-FV le signal reste faible (11 u.a. soit < 2% de l'amplitude maximale possible) mais cependant supérieur au BF de 6 u.a. vu en fig. 15, ce qui suggère l'existence d'un léger marquage non spécifique résiduel.

30

Le tableau ci-dessous fait la synthèse des résultats sur l'analyse en CMF duplex des O.N. représentatifs des gènes Facteur II et Facteur V et montre que la détection de fragments d'ADN marqués en fluorescence est simple et réalisable sur un
5 seul tube.

μ S de capture	Figures	μ S-FV	μ S-FV	μ S-FII	μ S-FII
Allèles présents			MFI (u.a.)		MFI (u.a.)
FV + FII	12 et 13	Positif	831	<i>Positif</i>	247
Chauffage >> T _m (Contrôle neg.)	14 et 15	Négatif	6	<i>Négatif</i>	18
FV	16 et 17	Positif	266	<i>Négatif</i>	21
FII	18 et 19	Négatif	11	<i>Positif</i>	77

Exemple 12 : Détection différentielle d'une mutation SNP :

1. Principe

10 La détection de mutations ponctuelles (SNP) est basée sur la technique OLA (Landegren, Science 1988, 241 :1077-80). Cette technique passe par :

• la formation d'un complexe ternaire entre la sonde de capture (immobilisée ici sur une famille de billes), le brin d'ADN monocaténaire complémentaire issu des amplicons du gène correspondant et une sonde de révélation
15 contigue à la sonde de capture.

• Le couplage covalent de la sonde de capture et de la sonde de révélation - hybridées avec le brin complémentaire - par l'action spécifique d'une ligase qui ne raboute que les brins exactement contigus et parfaitement hybridés. L'absence de complémentarité sur la seule base portant la mutation suffit à empêcher ce couplage
20 (noté ici ligature).

• Une dissociation en conditions astringentes des doubles brins d'ADN.

Dans le cas où la ligase a trouvé les conditions de spécificité requises pour son action, et seulement dans ce cas, la sonde de révélation reste associée (couplage covalent) à la sonde de capture et donc au support correspondant (ici une bille).

L'application de ce principe dans le cadre de l'invention est illustrée par les
5 Figures 20 et 21.

Remarque : La CMF permet de mesurer simultanément des intensités de fluorescence de niveaux très différents (du bruit de fond au marquage +++) sur des groupes de billes différenciables sur la base d'un autre paramètre (taille ou fluorescence de longueur d'onde différente).

10

2. Matériel

La détection de mutations ponctuelles (SNP), dont le principe est illustré par la Fig. 21, nécessite l'utilisation de deux types de μ S pour une détection différentielle. Les μ S utilisées ici sont chargées des sondes de capture ad hoc comme illustré dans
15 l'exemple 11 et sont telles que :

- les billes de diamètre 6,7 μ m portent une sonde de capture Facteur V sauvage (μ S-FVwt) construite selon la structure ci-dessous, indiquée de l'extrémité 5' vers 3' :

μ S-FVwt : NH₂ (C₆) TTT TTT TTT TTT ggA cAA AAT Acc TgT ATT ccT c (SEQ ID
20 N°1)

- les billes de diamètre 9,6 μ m portent une sonde de capture Facteur V mutant (μ S-FVmut) construite selon la structure ci-dessous, indiquée de l'extrémité 5' vers 3' :

μ S-FVmut : NH₂ (C₆) TTT TTT TTT TTT ggA cAA AAT Acc TgT ATT ccT T (SEQ
25 ID N°6)

Le groupement biotine à la surface des billes, nécessaire au système de l'invention dans les exemples qui suivent est apporté comme dans le paragraphe A par un oligonucléotide poly-(T)₃₀ et permet la fixation spécifique de ferrofluide-streptavidine (CaptivateTM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

30 La sonde contiguë à la sonde de capture permettant la révélation de la ligation porte un groupement phosphate en 5' et un marquage fluorescéine en 3' ; elle a été spécialement synthétisée par Proligo (Paris, F) et possède la séquence suivante :

PO₄²⁻-gcc TgT ccA ggg ATc TgcTcc-fluo (SEQ ID N°7).

Les amplicons permettant la formation du complexe ternaire sont issus de l'amplification par PCR d'un fragment du gène Facteur V sauvage et/ou mutant à partir d'ADN génomique ou de plasmides spécifiques, PCR réalisée en présence d'un
5 mélange pour PCR, réactif « Ampli-Mix » disponible dans la trousse GENECOLOR™ FV Leiden, (BioCytex, Marseille, F).

La solution de ligase permettant la formation d'une liaison covalente entre la sonde de capture et la sonde signal est le réactif dit « Ligation solution », ou solution de
ligature, c'est-à-dire une T4 Ligase dans son tampon spécial, dit « Ligation buffer »,
10 telle qu'utilisée dans les trousse GENECOLOR™ FV Leiden, (BioCytex, Marseille, F).

Les tampons utilisés ci-après sont de pH optimaux, astringents ou non, et permettent respectivement

- i) la déshybridation des amplicons appariés et leur réhybridation partielle
15 (§) (cf. note de la partie 2 (matériel) de l'exemple 12) sur les sondes de capture immobilisées,
- ii) l'action de la ligase et enfin
- iii) la déshybridation des amplicons et sondes non couplées après ligation.

Ils sont aussi tous issus de la trousse GENECOLOR™ FVLeiden, sous les
20 dénominations respectives de « Hybridization buffer » / tampon d'hybridation, « Ligation buffer »/ Tampon de ligature (aussi noté Tampon de neutralisation dans l'exemple 11, et « Washing solution » / Solution de lavage.

Le tampon de dilution pour analyse en cytométrie de flux est du PBS-Tween 20®
0,1%.

25 (§) Les conditions de stœchiométrie sont préalablement optimisées (excès d'amplicons, excès de sonde signal) pour obtenir la réhybridation d'une fraction significative de l'un des 2 brins d'ADN sur les sondes de capture immobilisées plutôt que sur son brin complémentaire.

30

3. Protocole

Les billes des 2 types (μS-FVwt et μS-FVmut) sont mélangées en quantités équivalentes et diluées en tampon d'hybridation à raison de 40 000 μS/μl au total. Dans

un micro-tube spécial PCR (PCR T 320-1N, Simport , Québec, C), sont distribués 5 µl de suspension de billes (soit 100 000 µS/test pour chaque type), les amplicons (3,75 µl/test) et la sonde de révélation FV (1 pmole sous 1,25µl de tampon d'hybridation). Le milieu réactionnel est homogénéisé (vortex) et incubé pendant 30 min à température ambiante (TA).

L'étape de ligation est ensuite assurée par une incubation pendant une heure après ajout de 100 µl de solution de ligation.

Après la ligation, l'excès d'amplicons et de sonde signal non impliqués dans le complexe ternaire est éliminé par séparation magnétique. Pour cela, le mélange réactionnel (Vt = 110µl) reçoit 10 µl de suspension de ferrofluides (SA-FF). Après une agitation (vortex) et une incubation de 10 min, le mélange est transféré en tube de 1 ml (tubes Ringer) et on procède à l'aimantation pendant 5 min avec un aimant puissant (MPC-S, Dynal , Compiègne, F). Les billes, collées contre la paroi du tube, sont asséchées par aspiration du liquide et remises en suspension avec 100 µl de Solution de lavage. La solution de lavage, de caractéristiques appropriées, permet le décrochage sélectif des produits associés aux billes uniquement par interaction non covalente (hybridation sans ligation) mais pas celui des sondes liées par covalence ni celui des SA-FF. Ce lavage est répété une deuxième fois.

Les billes sont finalement diluées dans 1 ml de tampon de dilution (PBS-Tween 20®), transférées en tube pour cytométrie (4 ml) et analysées en CMF.

4. Résultats

a) En présence de produits de PCR non reconnaissables par le système (ici produits issus de l'amplification du gène P2Y12, allèle sauvage, générée avec les réactifs de la trousse GENECOLOR™ P2Y12 G52T, BioCytex, Marseille, F), chacune des 2 billes donne un marquage proche de son bruit de fond (BF) intrinsèque, en pratique (Figures 23 et 24) :

- µS-FVwt : 6,0 u.a.
- µS-FV mut : 15,3 u.a.

b) En présence de produits de PCR correspondant à l'allèle sauvage du gène Facteur V (FVwt, PCR générée avec les réactifs de la trousse GENECOLOR™ Facteur

V Leiden, BioCytex, Marseille, F), les billes μ S-FVwt montrent un marquage nettement positif alors que les billes μ S-FVmut donnent un marquage proche de leur bruit de fond intrinsèque, en pratique (Figures 25 à 28):

- μ S-FVwt : 313 u.a. (versus BF à 6,0 u.a.)
- 5 • μ S-FV mut : 17,4 u.a. . (versus BF à 15,3 u.a.)

Le signal de chaque bille dans le test est superposé à son BF non spécifique (μ S-FVwt : Fig 27 ; μ S-FVmut : Fig 28). Ceci suggère une gamme de travail large pour la spécificité FVwt (de 6 à plus de 300 u.a.) et un marquage non spécifique quasiment nul sur la bille FVmut, en absence de son ligand spécifique (amplicons FVmut).

- 10 c) En présence de produits de PCR correspondant à l'allèle muté du gène Facteur V (FVmut, PCR générée avec les réactifs de la trousse GENECOLOR™ FV Leiden, BioCytex, Marseille, F), les billes μ S-FVmut montrent un marquage nettement différent du BF, correspondant au niveau de signal positif maximum possible avec le matériel disponible. Les billes μ S-FVwt donnent un marquage faible par rapport au
- 15 signal positif maximum (14,8 versus 313 u.a. soit < 2% de l'amplitude maximum de variation), bien que différent de leur bruit de fond intrinsèque, ce qui suggère l'existence d'un marquage non spécifique faible mais réel sur ces billes en présence d'amplicons FV mut.

En pratique (Figures 29 à 32) :

- 20 • μ S-FVwt : 14,8 u.a. (versus BF à 6,0 u.a.)
- μ S-FV mut : 43,4 u.a. (versus BF à 15,3 u.a.)

Pour la détection de cette mutation FV, en présence éventuellement de l'autre allèle, les amplitudes (gammes) de travail respectives sont donc, au mieux :

- FV wt : de 15 à 300 u.a.**
- 25 **FV mut : de 17 à 43 u.a.**

Le décalage observé sur l'intensité maximale (300 u.a. versus 43 u.a.) est attribuable à une efficacité de coating moins bonne pour les billes μ S-FVmut ; comme dans l'exemple n°11, ces billes de 9,7 μ m donnent un moins bon niveau de coating. A noter que, grâce au principe de l'invention, d'autres lots, types, origines et diamètres de

30 billes peuvent être utilisés à volonté pour obtenir les caractéristiques optimales de capacité de charge et/ou de BF intrinsèque, sans se soucier de leurs propriétés magnétiques, ce qui étend le choix de fourniture de façon significative.

d) En présence des produits de PCR correspondant aux 2 allèles du gène Facteur V simultanément (FVmut et FV wt, PCR générée avec les réactifs de la trousse GENECOLOR™ Facteur V Leiden, BioCytex, Marseille, F), les billes μ S-FVmut ainsi que les billes μ S-FVwt montrent un marquage nettement positif, bien qu'à des niveaux d'intensité plus faibles que ceux observés avec les amplicons spécifiques d'un seul allèle utilisés seuls, en pratique (Fig. 33 à 36) :

- μ S-FVwt : 187 u.a. (soit $\sim 2/3$ de l'amplitude maximum de marquage spécifique : [187-15] / [300-15])
- μ S-FVmut : 33 u.a. (soit $\sim 2/3$ de l'amplitude maximum de marquage spécifique : [33-17] / [43-17])

Le tableau ci-dessous fait la synthèse des résultats sur l'analyse en CMF duplex de la mutation Leiden du Facteur V et montre que la définition du génotype FV est simple et réalisable sur un seul tube.

μ S de capture	Figures	μ S-FV wt	μ S-FV wt	μ S-FV mut	μ S-FV mut
Allèles présents			MFI (u.a.)		MFI (u.a.)
P2Y12 G52 (Contrôle neg.)	23 à 24	Négatif	6,0	<i>Négatif</i>	15,3
FV wt/wt	25 à 28	Positif	313	<i>Négatif</i>	17,3
FV mut /mut	29 à 32	Négatif	14,8	<i>Positif</i>	43,4
FV wt/mut	33 à 36	Positif	187	<i>Positif</i>	33

5. Extensions

Les exemples précédents, en particulier les n°s 1, 2 et 5 ont déjà illustré, dans le cadre de détections immunologiques, la possibilité d'utiliser un plus grand nombre de familles de billes aisément différenciables par leurs tailles et ou un niveau variable d'une seconde fluorescence différente de celle qui sert à la mesure. Il ressort de la mise en

concordance de tous ces exemples qu'une analyse Multiplex des 2 allèles des gènes FV et FII en un tube unique serait très facile, en utilisant par exemple :

• les mêmes billes carboxylées qu'illustrées dans l'exemple 12 (FV mut diamètre 9,6µm et FVwt diamètre 6,7 µm) ainsi que les billes carboxylées de 4,4 µm et porteuses de 2 niveaux différents de fluorescence rouge telles qu'illustrées dans les exemples 4 et 5, pour porter les deux sondes spécifiques des allèles sauvage et mutant du FII.

• Deux fluorescences différentes pour la mesure selon le principe de la Fig. 20, qui ne requiert qu'un seul type de bille par mutation.

On peut généraliser ces 2 approches en considérant que :

• la première, utilisant seulement une fluorescence pour la mesure, permet de détecter autant d'allèles différents que l'on peut différencier de familles de billes simultanément ,

• la seconde, utilisant 2 fluorescences différentes pour la mesure, permet de génotyper autant de gènes que l'on peut différencier de familles de billes simultanément .

Dans tous les cas, l'avantage majeur apporté par l'invention est que le choix des billes pour l'analyse Multiplex n'impose aucune condition limitante sur leur propriétés magnétiques intrinsèques.

Exemple 13 : Détection différentielle d'une mutation SNP

1. Principe de la Figure 37:

Dans la Fig. 37, comme dans la figure 21, la base critique (spécificité de SNP) est portée par chacune des sondes de capture, spécifiques d'allèle, et couplée chacune à un type de bille différent (différenciés par la taille). Ce système ne réclame, pour l'analyse du signal en CMF, qu'une analyse par comptage des billes sur la base des paramètres de taille et de structure, permettant soit d'utiliser un appareillage dépourvu d'un détecteur de fluorescence et donc moins coûteux, soit de tirer parti d'autres tailles pour différencier les familles de billes entre elles.

2. Matériel :

La détection de mutations ponctuelles (SNP), dont le principe est illustré par la Fig. 37, nécessite l'utilisation de deux types de μ S pour une détection différentielle. Les μ S utilisées ici sont chargées des sondes de capture ad hoc comme illustré dans le

5 paragraphe A et sont telles que :

- les billes de diamètre 6,7 μ m portent une sonde de capture Facteur V sauvage (μ S-

FVwt) construite selon la structure ci-dessous, indiquée de l'extrémité 5' vers 3' :

μ S-FVwt : NH₂ (C₆) TTT TTT TTT TTT ggA cAA AAT Acc TgT ATT ccT c (SEQ ID

10 N°1)

- les billes de diamètre 9,6 μ m portent une sonde de capture Facteur V mutant (μ S FVmut) construite selon la structure ci-dessous, indiquée de l'extrémité 5' vers 3' :

μ S-FVmut : NH₂ (C₆) TTT TTT TTT TTT ggA cAA AAT Acc TgT ATT ccT T (SEQ ID N°6)

15

La sonde contiguë à la sonde de capture permettant la révélation de la ligation porte un groupement phosphate en 5' et un groupement biotine en 3' ; elle a été spécialement synthétisée par Proligo (Paris, F) et possède la séquence suivante :

PO₄²⁻ -gcc TgT ccA ggg ATc TgcTcc TTT TTT TTT TTT TTT TTT-Biotine (SEQ ID

20 N°8)

Le groupement biotine sur la sonde de capture, nécessaire au système de l'invention dans les exemples qui suivent permet la fixation spécifique de ferrofluide-streptavidine (Captivate™, Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

Les amplicons permettant la formation du complexe ternaire sont issus de

25 l'amplification par PCR d'un fragment du gène Facteur V sauvage et/ou mutant à partir d'ADN génomique ou de plasmides spécifiques, PCR réalisée en présence d'un mélange pour PCR, réactif « Ampli-Mix » disponible dans la trousse GENECOLOR™ FV Leiden, (BioCytex, Marseille, F).

La solution de ligase permettant la formation d'une liaison covalente entre la

30 sonde de capture et la sonde signal est le réactif dit « Ligation solution »/ Solution de ligation i.e. une T4 Ligase dans son tampon spécial, dit « Ligation buffer », telle qu'utilisée dans les trousse GENECOLOR™ FV Leiden, (BioCytex, Marseille, F).

Les tampons utilisés ci-après sont de pH optimaux, astringents ou non, et permettent respectivement

- i) la déshybridation des amplicons appariés et leur réhybridation partielle (§) (cf. ci-dessous) sur les sondes de capture immobilisées,
- 5 ii) l'action de la ligase et enfin
- iii) la déshybridation des amplicons et sondes non couplées après ligation.

Ils sont aussi tous issus de la trousse GENECOLOR™ FVLeiden, sous les dénominations respectives de « Hybridization buffer » / tampon d'hybridation, « Ligation buffer »/ Tampon de ligation (aussi noté Tampon de neutralisation dans 10 l'exemple A, et « Washing solution» / Solution de lavage.

Le tampon de dilution pour analyse en cytométrie de flux est du PBS-Tween 20® 0,1%

(§) Les conditions de stœchiométries sont préalablement optimisées (excès 15 d'amplicons, excès de sonde signal) pour obtenir la réhybridation d'une fraction significative de l'un des 2 brins d'ADN sur les sondes de capture immobilisées plutôt que sur son brin complémentaire.

3. Protocole:

20 Les billes des 2 types (μ S-FVwt et μ S-FVmut) sont mélangées en quantités équivalentes et diluées en tampon d'hybridation à raison de 40 000 μ S/ μ l au total. Dans un micro-tube spécial PCR (PCR T 320-1N, Simport, Québec, C), sont distribués 5 μ l de suspension de billes (soit 100 000 μ S/test pour chaque type), les amplicons (3,75 μ l/test) et la sonde de révélation FV (1 pmole sous 1,25 μ l de tampon d'hybridation). Le 25 milieu réactionnel est homogénéisé (vortex) et incubé pendant 30 min à température ambiante (TA).

L'étape de ligation est ensuite assurée par une incubation pendant une heure après ajout de 100 μ l de solution de ligation.

30 Après la ligation, l'excès d'amplicons et de sonde signal non impliqués dans le complexe ternaire est éliminé par séparation magnétique. Pour cela, le mélange réactionnel ($V_t = 110\mu$ l) reçoit 10 μ l de suspension de ferrofluides (SA-FF). Après une agitation (vortex) et une incubation de 10 min, le mélange est transféré en tube de 1 ml (tubes Ringer) et on procède à l'aimantation pendant 5 min avec un aimant puissant

(MPC-S, Dynal, Compiègne, F). Les billes, collées contre la paroi du tube, sont asséchées par aspiration du liquide et remises en suspension avec 100 µl de Solution de lavage. La Solution de lavage, de caractéristiques appropriées, permet le décrochage sélectif des produits associés aux billes uniquement par interaction non covalente (hybridation sans ligation) mais pas celui des sondes liées par covalence ni celui des SA-FF. Ce lavage est répété une deuxième fois.

Les billes sont finalement diluées dans 1 ml de tampon de dilution (PBS-Tween 20®), transférées en tube pour cytométrie (4 ml) et analysées en CMF.

10 **4. Résultats:**

a) En présence de produits de PCR non reconnaissables par le système (ici produits issus de l'amplification du gène P2Y12, allèle sauvage, générée avec les réactifs de la trousse GENECOLOR™ P2Y12 G52T, BioCytex, Marseille, F), chacune des 2 billes donne un marquage proche de son bruit de fond (BF) intrinsèque, en pratique (Fig. 40):

- 15 • Nombre de µS-FVwt : 125
- Nombre de µS-FVmut : 15

b) En présence de produits de PCR correspondant à l'allèle sauvage du gène Facteur

V (FVwt, PCR générée avec les réactifs de la trousse GENECOLOR™ Facteur V Leiden, BioCytex, Marseille, F), les billes µS-FVwt montrent un marquage nettement positif alors que les billes µS-FVmut donnent un marquage proche de leur bruit de fond intrinsèque, en pratique (Fig. 41 et 42):

- Nombre de µS-FVwt : 2222
- Nombre de µS-FVmut : 294

25 c) En présence de produits de PCR correspondant à l'allèle muté du gène Facteur V (FVmut, PCR générée avec les réactifs de la trousse GENECOLOR™ FV Leiden, BioCytex, Marseille, F), les billes µS-FVmut montrent un marquage nettement différent du BF, correspondant au niveau de signal positif maximum possible avec le matériel disponible positif alors que les billes µS-FVwt donnent un marquage proche de leur
30 bruit de fond intrinsèque. En pratique (Fig. 43 et 44) :

- Nombre de µS-FVwt : 32
- Nombre de µS-FVmut : 600

Le tableau ci-dessous fait la synthèse des résultats sur l'analyse en CMF duplex de la mutation Leiden du Facteur V et montre que la définition du génotype FV est simple et réalisable sur un seul tube.

5

μ S de capture	Fig	μ S-FVwt (6.7 μ m)		μ S-FVmut (9.6 μ m)	
Allèles présents			Nombre de billes		Nombre de billes
P2Y12 G52 (Contrôle neg.)	39 et 40	Négatif	125	Négatif	15
FV wt/wt	41 et 42	Positif	2222	Négatif	294
FV mut /mut	43 et 44	Négatif	35	Positif	600

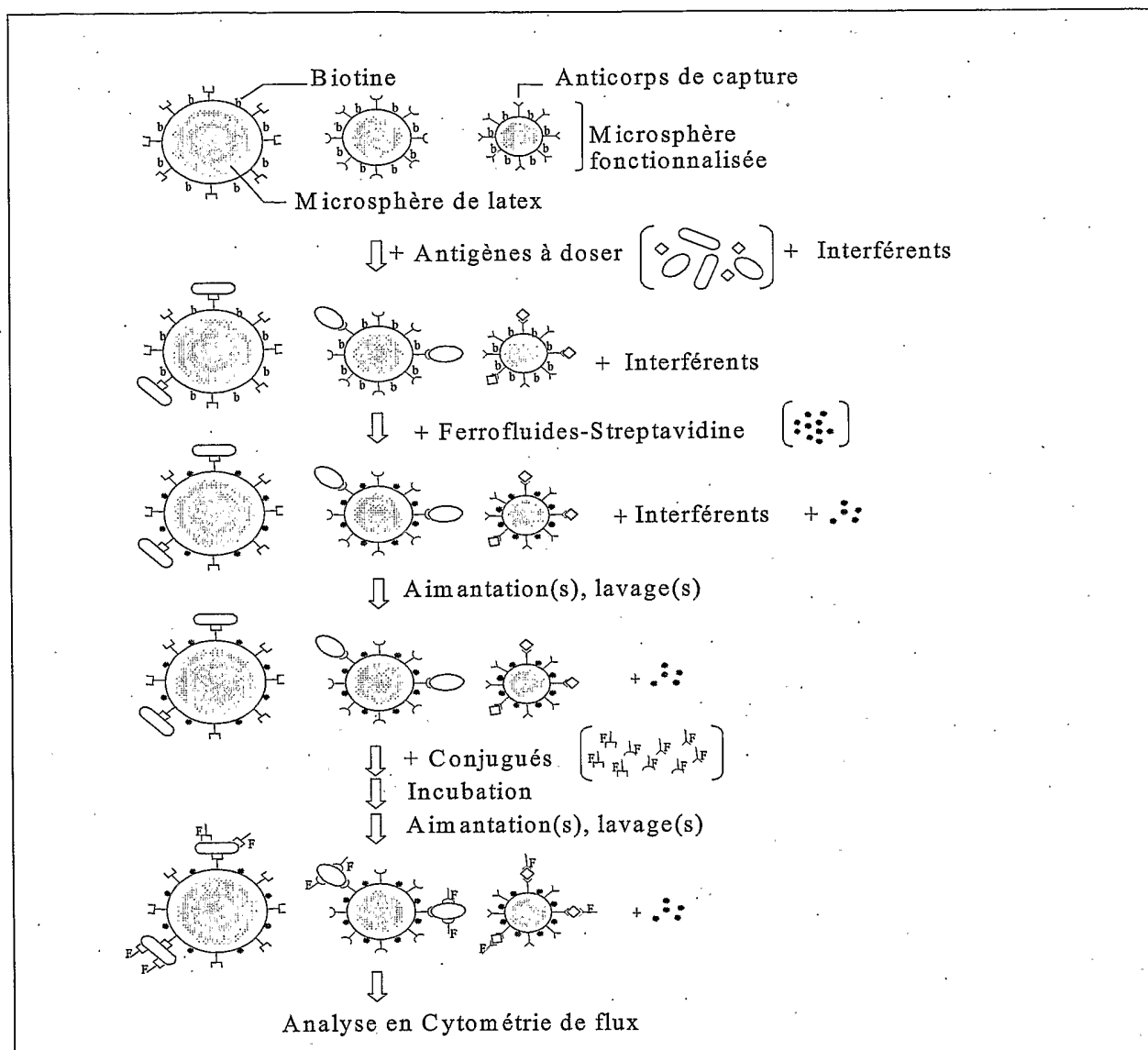
Revendications

1. Procédé de détection et/ou de quantification multiplex d'analytes susceptibles
5 d'être contenus dans un échantillon à l'aide de microsphères non magnétiques
fonctionnalisées, lesdits analytes pouvant être le cas échéant préalablement marqués par
un marqueur, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) la mise en présence dudit échantillon avec une suspension de populations
de microsphères non magnétiques fonctionnalisées, lesdites microsphères
10 portant à leur surface :
- pour toutes les populations de microsphères, un composé A formant un
premier membre d'une paire de liaison, ledit composé A étant également
caractérisé en ce qu'il ne peut pas se lier avec lesdits analytes, et
 - pour chacune des populations de microsphères, un composé B, différent
15 pour chaque population, capable de former une paire de liaison
spécifique avec l'un desdits analytes de l'échantillon,
- b) l'addition au milieu réactionnel obtenu à l'étape a) d'un ferrofluide,
lequel ferrofluide contient des particules magnétiques qui portent à leur surface
un second membre de liaison capable de former une paire de liaison spécifique
20 avec le composé A,
- c) au moins une étape de lavage par séparation magnétique des
microsphères magnétisées à l'étape b),
- d) le cas échéant lorsque lesdits analytes ne sont pas préalablement
marqués, la mise en présence de la suspension des microsphères magnétisées
25 obtenues à l'étape c) avec une solution d'au moins un conjugué, ledit conjugué
comprenant un composé C capable de reconnaître et de se lier spécifiquement
avec l'un desdits analytes et un marqueur, cette étape d) étant suivie de
préférence d'au moins une étape de lavage des microsphères par séparation
magnétique, et,
- 30 e) la détection et/ou la quantification dudit marqueur à la surface des
microsphères.

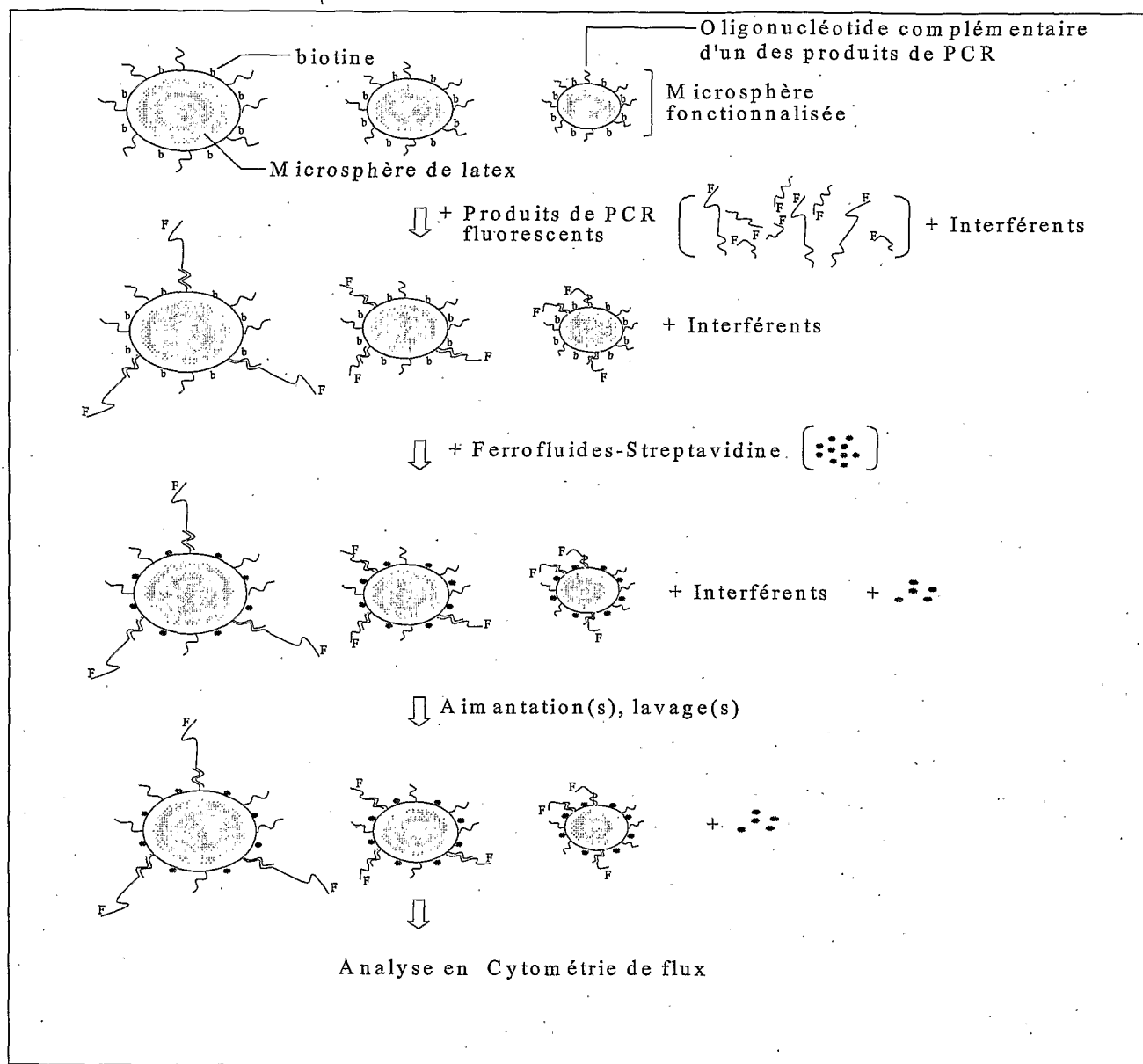
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que deux au moins desdites populations de microsphères possèdent en outre au moins une caractéristique physique intrinsèque permettant de les différencier entre elles.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite paire de
5 liaison formée entre le composé A et le second membre fixé à la surface des ferrofluides, est de préférence choisie au sein du groupe constitué par les paires de liaison spécifique de type biotine/avidine ou biotine/streptavidine, enzyme/cofacteur, lectine/carbohydrate et anticorps/haptène.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que
10 les microsphères sont dans un matériau choisi au sein du groupe constitué par le latex, un polymère, un copolymère, le verre ou la silice.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le ou les marqueurs utilisés sont fluorescents.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la
15 détection et/ou la quantification dudit marqueur à l'étape e) du procédé est réalisée par cytométrie de flux.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ladite caractéristique physique intrinsèque permettant de différencier les au moins 2 populations de microsphères est la taille et/ou une propriété optique desdites microsphères.
- 20 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les microsphères ont une taille comprise entre 0,3 et 100 μm de diamètre.
9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la propriété optique est la longueur d'onde d'émission et/ou l'intensité de la fluorescence desdites microsphères.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que
25 lesdits analytes sont de type protéique et dérivés, ou sont des acides nucléiques.
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que lesdits analytes sont des composés pouvant être présents soit en solution dans un liquide, soit présents à la surface d'une cellule ou d'une particule en suspension dans l'échantillon.
- 30 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que lesdits composés sont des toxines protéiques, ou en ce que ladite cellule ou particule est un microorganisme, tel qu'une bactérie ou un virus.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que ledit composé B est choisi au sein du groupe constitué par les protéines et les acides nucléiques.
- 5 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que ledit composé C dudit conjugué utilisé à l'étape d) est choisi au sein du groupe constitué par les protéines et les acides nucléiques.
15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que lesdits analytes sont des acides nucléiques et en ce qu'à l'étape a), le composé B est un
10 acide nucléique capable de s'hybrider spécifiquement avec l'un desdits analytes.
16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que lesdits analytes sont des produits PCR.
17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que lesdits produits PCR sont obtenus marqués.
- 15 18. Procédé selon la revendication 15 ou 16, caractérisé en ce que ledit composé C dudit conjugué est un acide nucléique capable de s'hybrider spécifiquement avec l'un desdits analytes.
19. Utilisation du procédé selon la revendication 18 pour la détection et/ou la quantification multiplex de SNPs.
- 20 20. Utilisation du procédé selon la revendication 19, caractérisée en ce que la détection et/ou la quantification multiplex de SNPs est réalisée par la méthode OLA.
21. Kit pour la détection et/ou la quantification multiplex d'analytes susceptibles d'être contenus dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend :
- 25 a) un réactif 1 comprenant une suspension de populations de microsphères non magnétiques fonctionnalisées, lesdites microsphères portant à leur surface:
- un composé A formant un premier membre d'une paire de liaison ;
 - un composé B capable de former une liaison spécifique avec l'un desdits analytes de l'échantillon, et
- 30 b) un réactif 2 comprenant un ferrofluide qui contient des particules magnétiques portant à leur surface un second membre de liaison capable de former une paire de liaison spécifique avec ledit composé A ; et

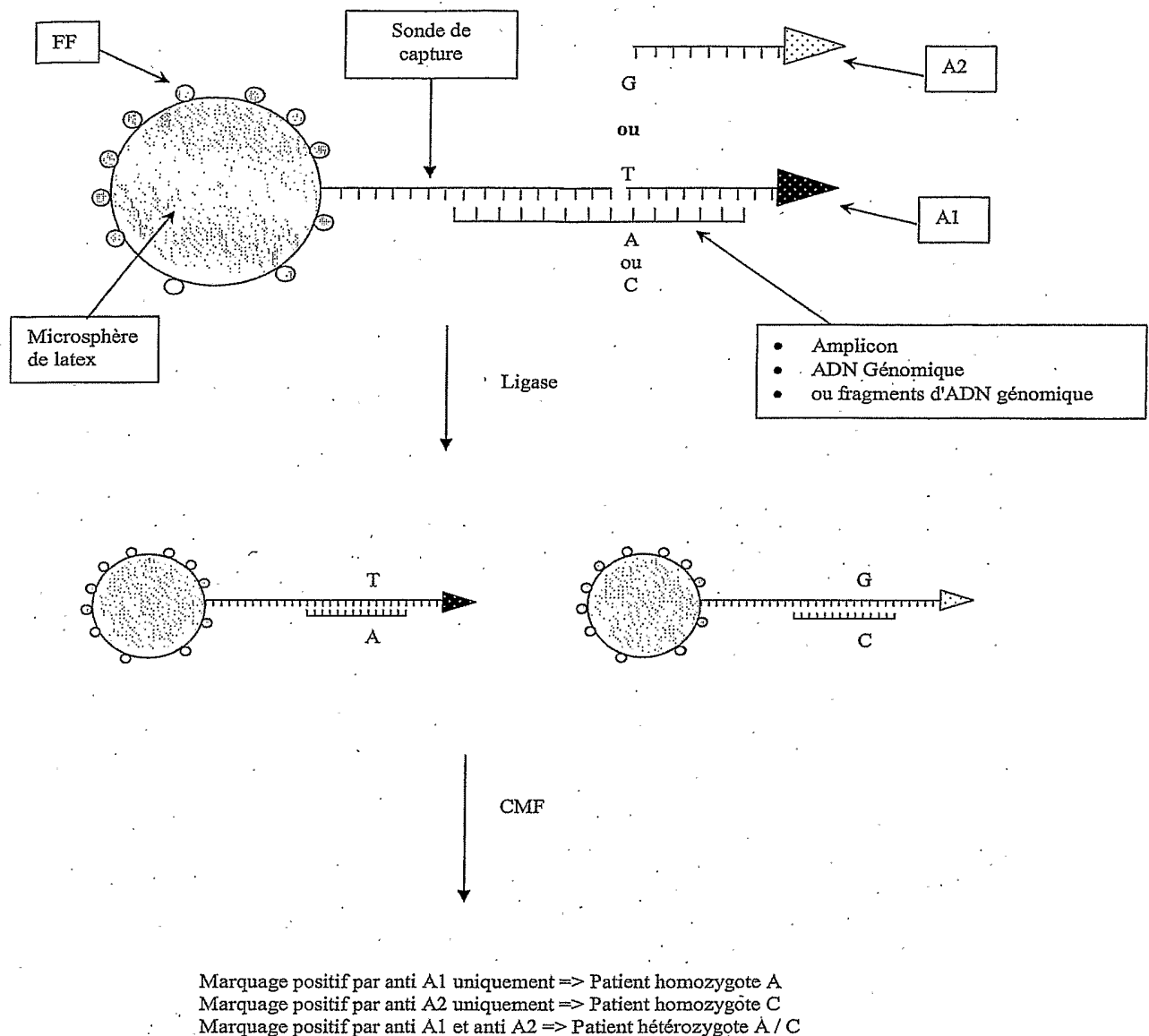
- c) un réactif 3 comprenant une solution d'au moins un conjugué, ledit conjugué comprenant un composé C capable de réagir spécifiquement avec lesdits analytes et un marqueur capable d'être détecté.
22. Kit selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend en outre :
- 5 - un réactif 4 comprenant lesdits analytes susceptibles d'être contenus dans un échantillon.
23. Kit selon la revendication 21 ou 22, caractérisé en ce qu'il comprend en outre :
- un réactif 5 composé d'un tampon de dilution ; et
- un réactif 6 composé d'un tampon de lavage.
- 10 24. Kit selon l'une quelconque des revendications 21 à 23, caractérisé en ce qu'il comprend en outre :
- un réactif 7 comprenant un tampon de neutralisation de l'aggrégation des différentes microsphères.

**Figure 1**

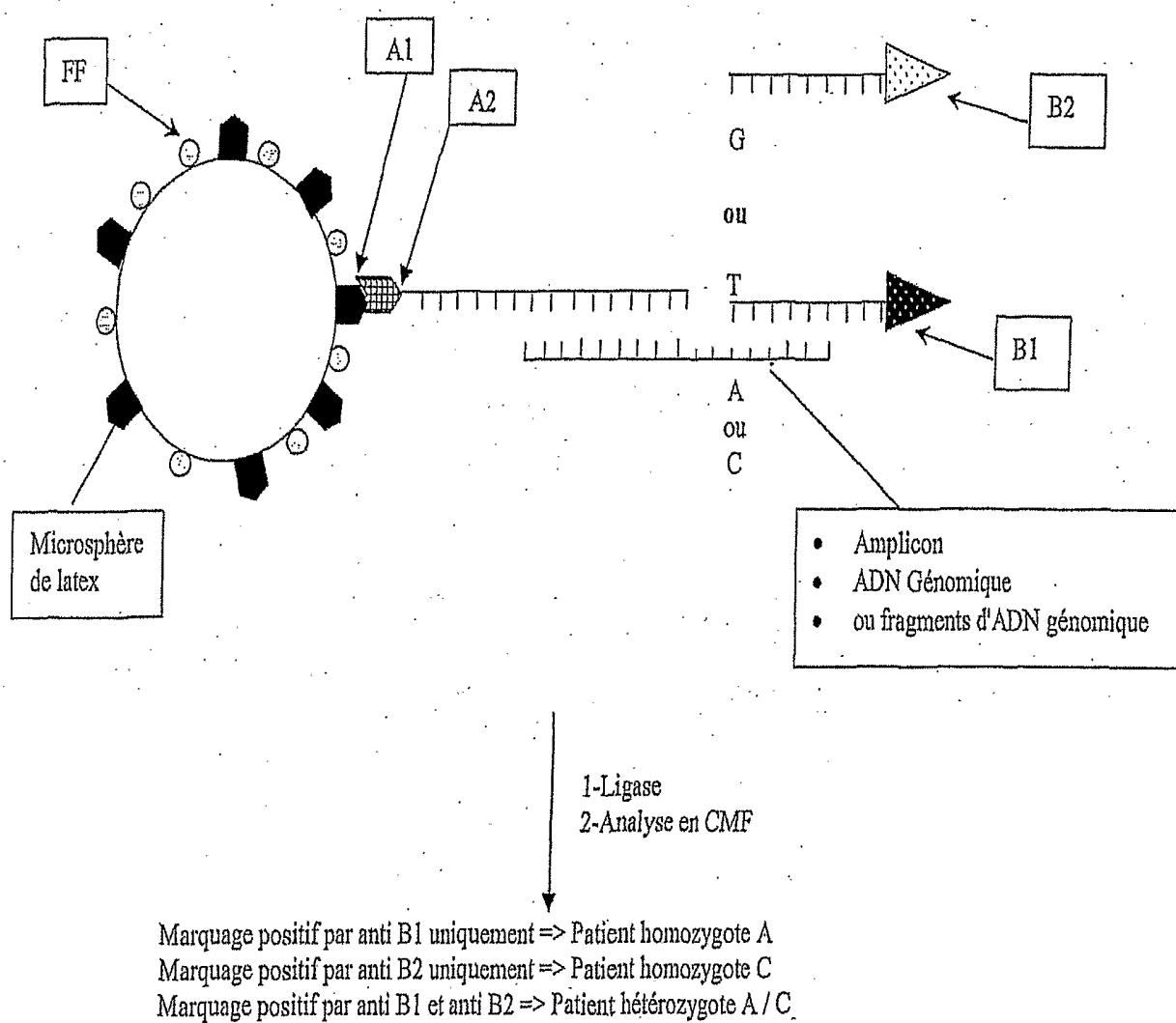
2/22

**Figure 2**

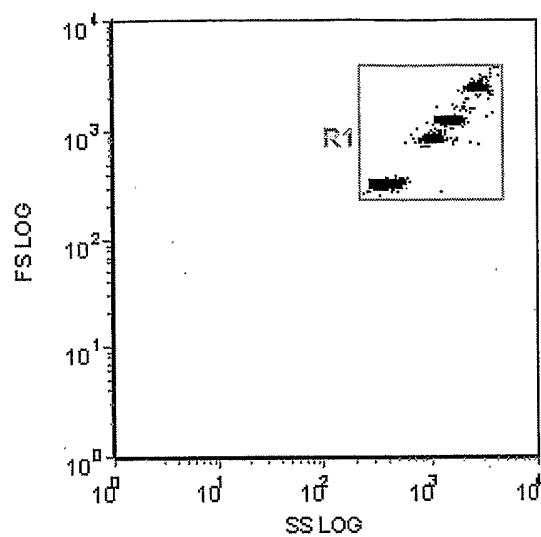
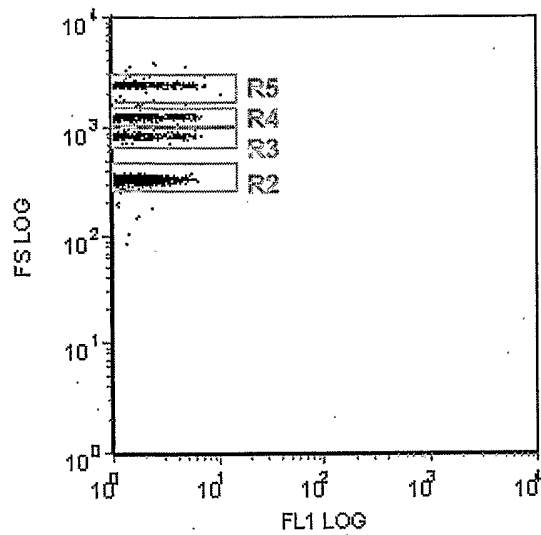
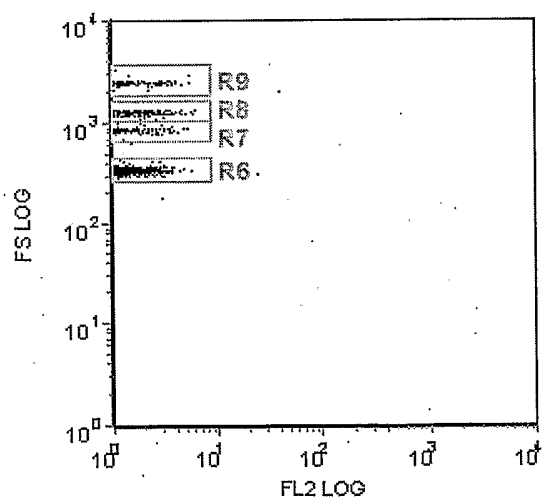
3/22

**Figure 3**

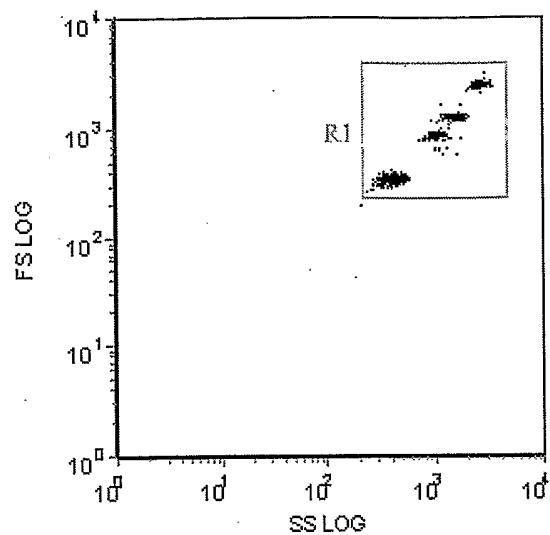
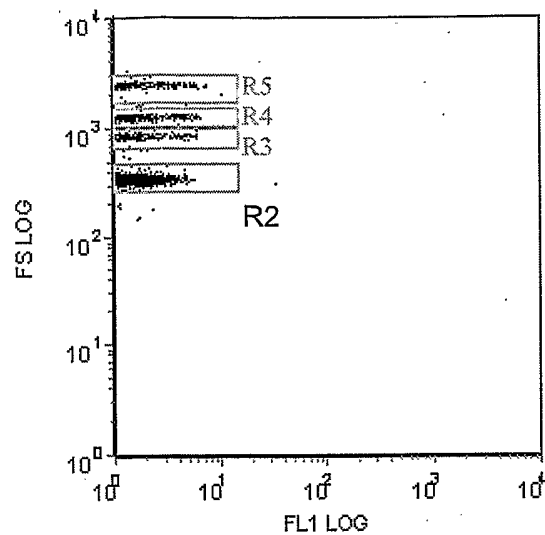
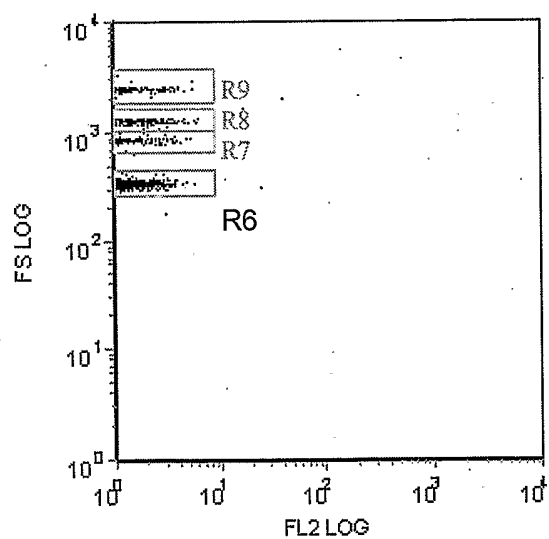
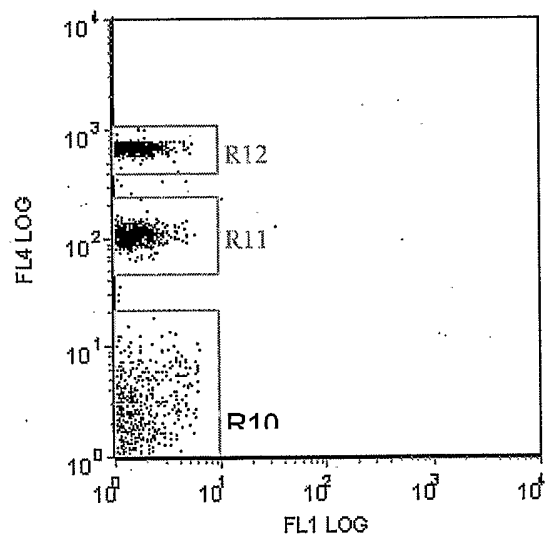
4/22

**Figure 4**

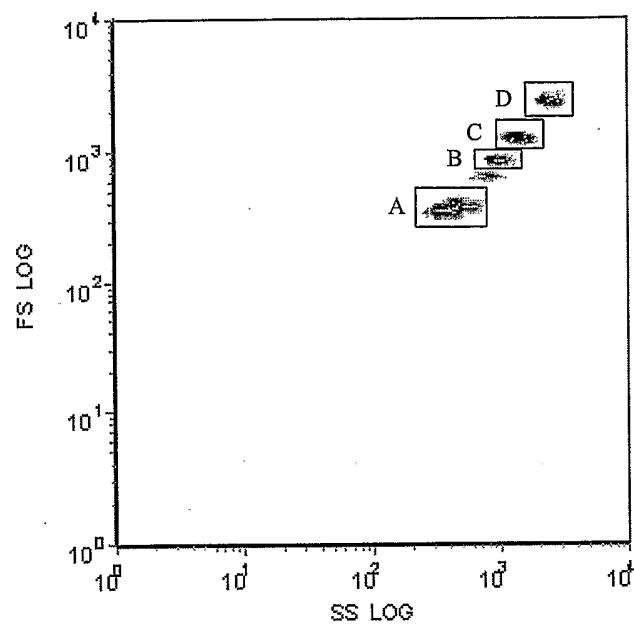
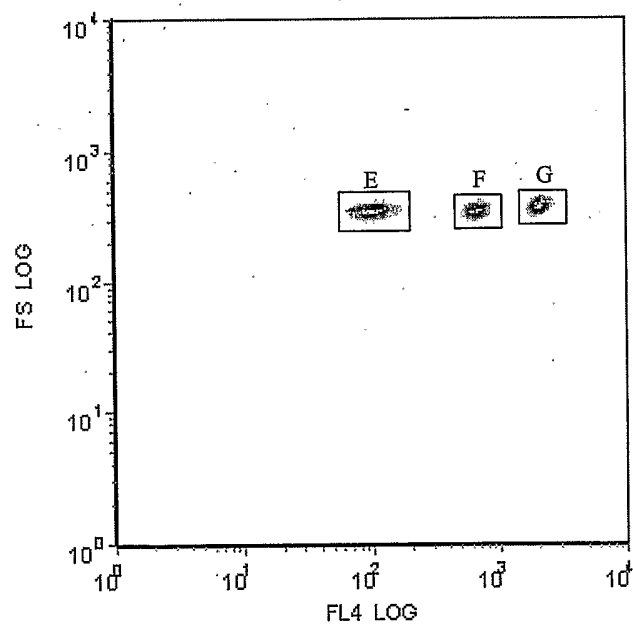
5/22

**Figure 5A****Figure 5B****Figure 5C**

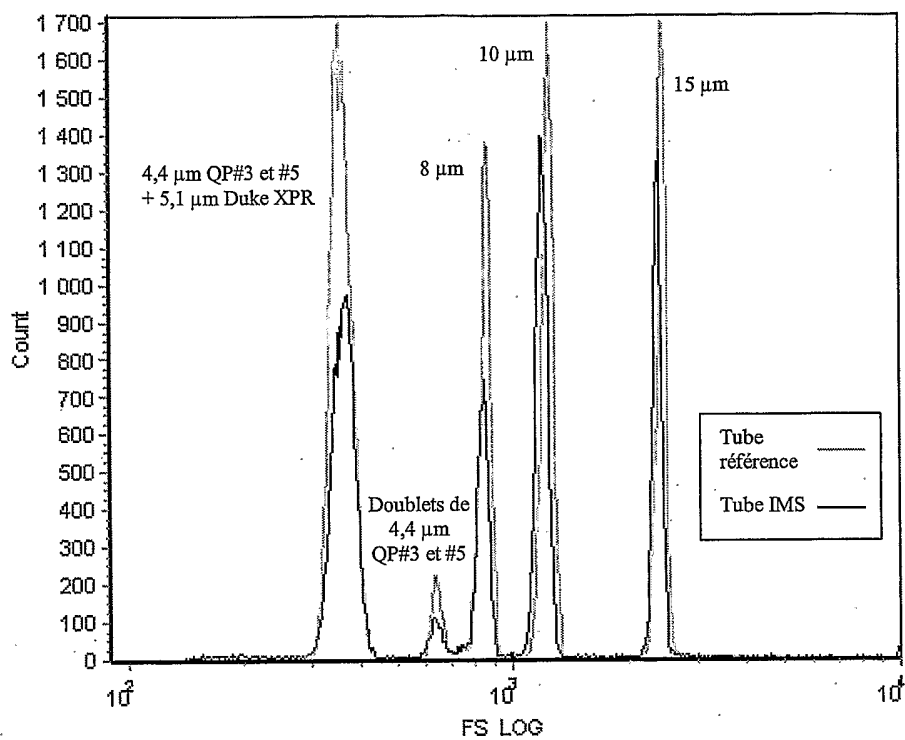
6/22

**Figure 6A****Figure 6B****Figure 6C****Figure 6D**

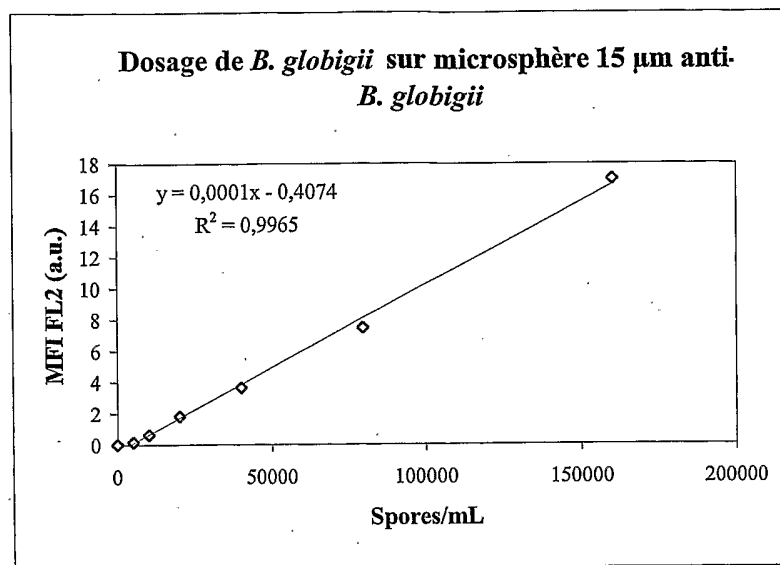
7/22

**Figure 7A****Figure 7B**

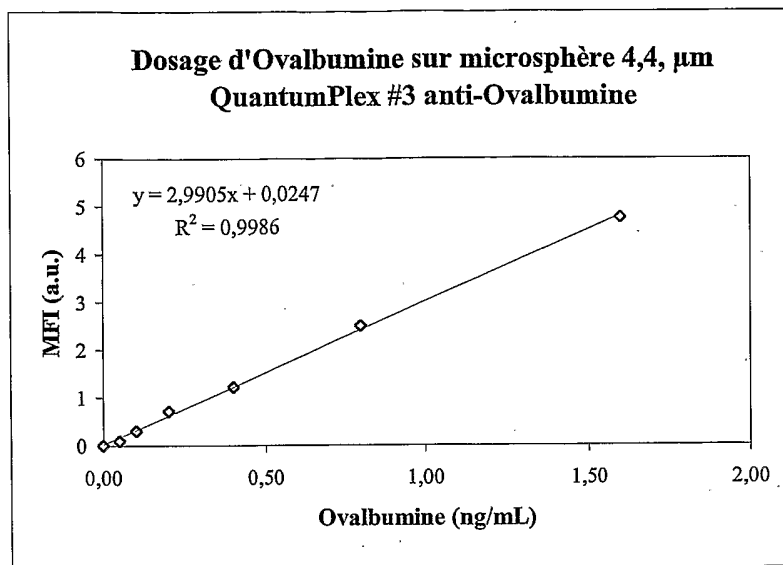
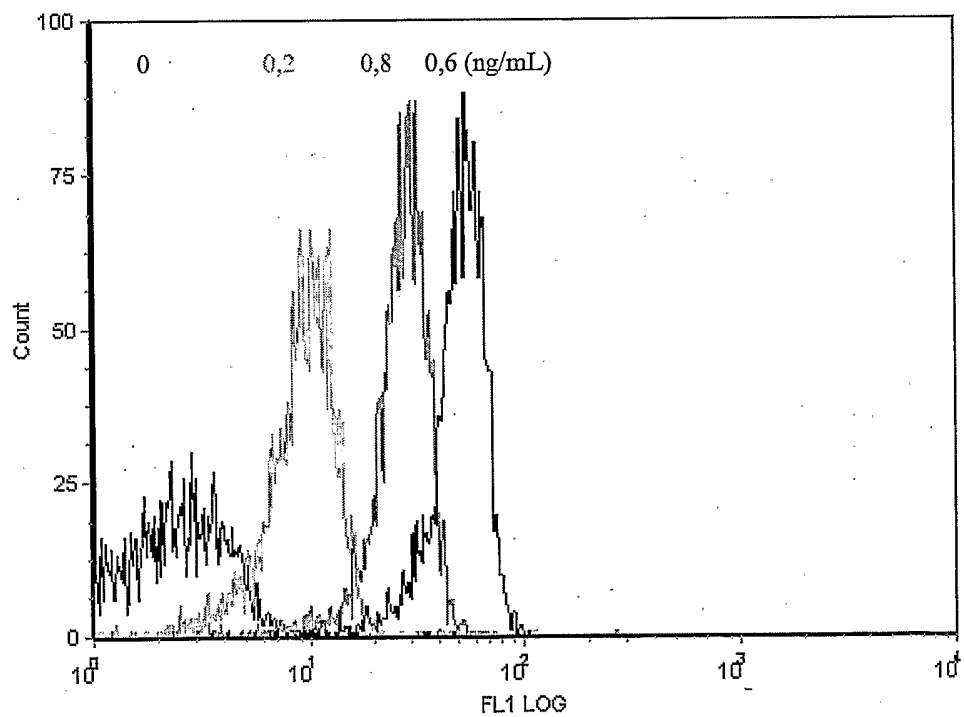
8/22

**Figure 8**

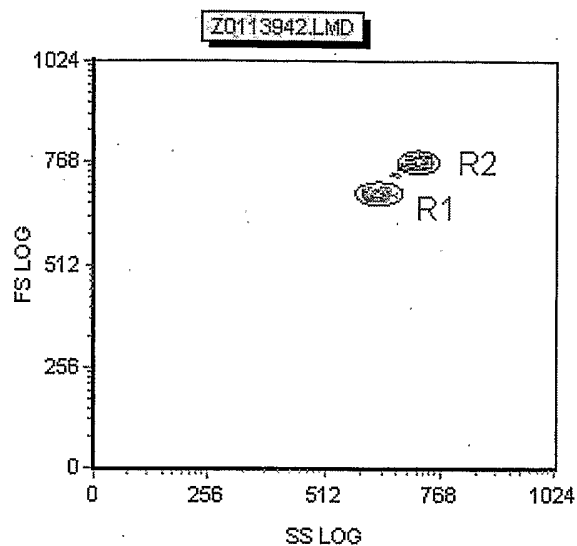
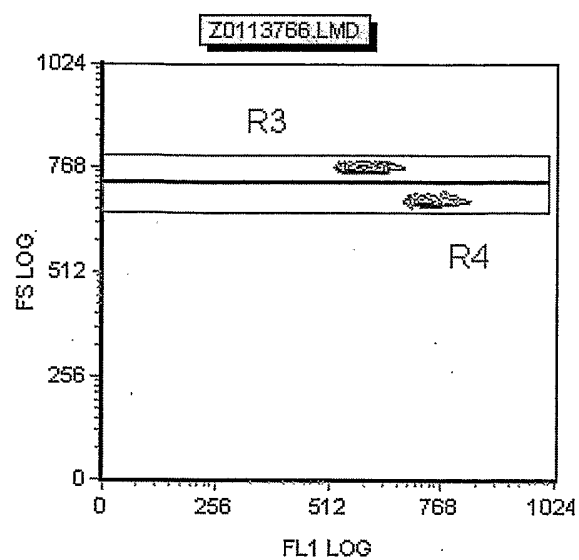
9/22

**Figure 9**

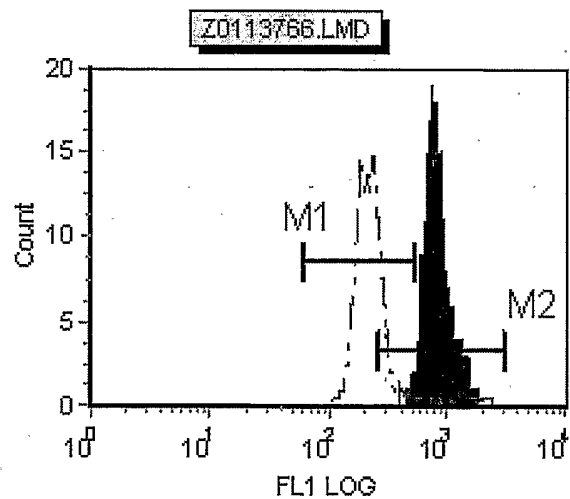
10/22

**Figure 10A****Figure 10B**

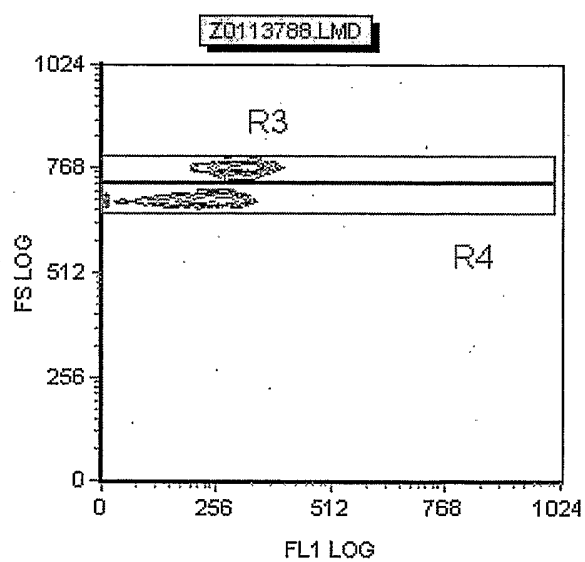
11/22

**Figure 11**

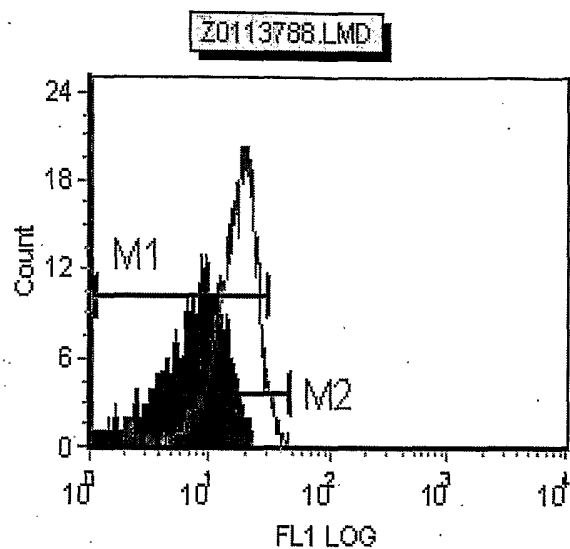
(FII + FV) + O.N. II et O.N. V

Figure 12

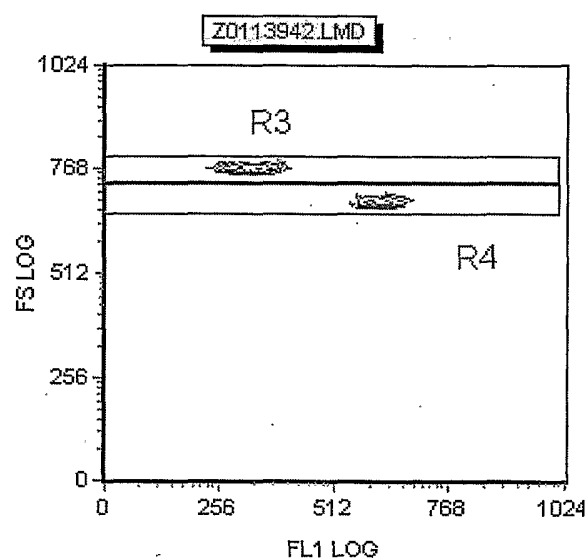
M1 = 247 et M2 = 831

Figure 13(FII + FV) + O.N. II et O.N. V
(contrôle négatif, déshybridé par la chaleur)**Figure 14**

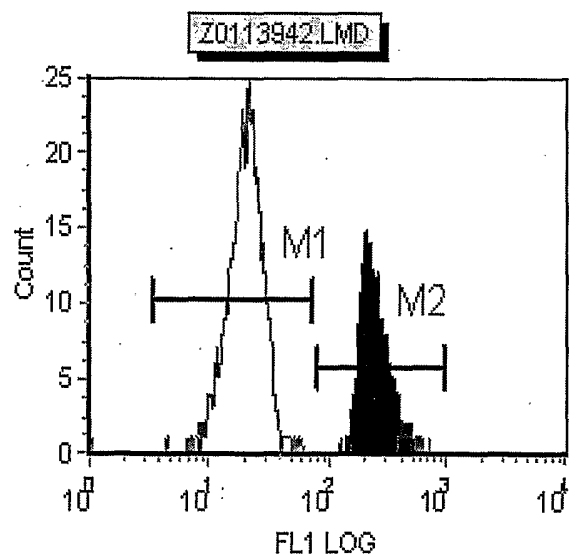
12/22



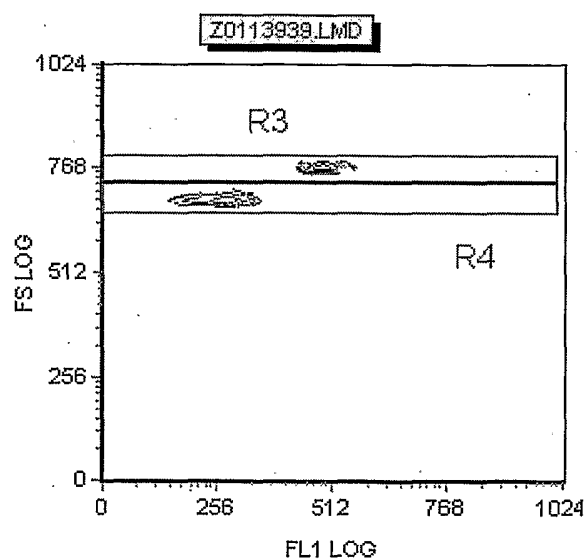
M1 = 6 et M2 = 18

Figure 15

(FII + FV) + O.N. V

Figure 16

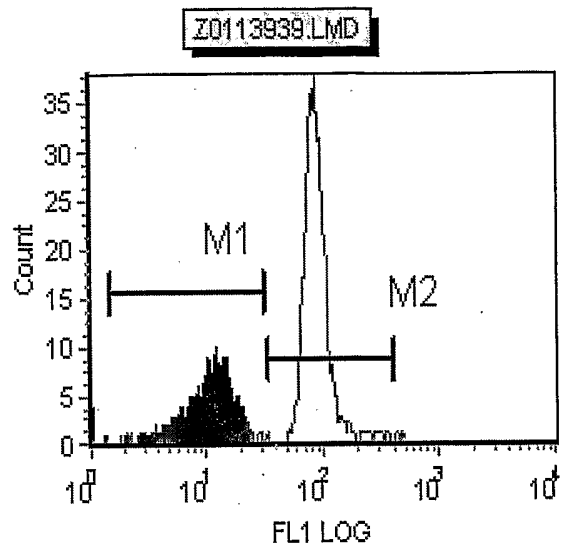
M1 = 21 et M2 = 266

Figure 17

(FII + FV) + O.N. II

Figure 18

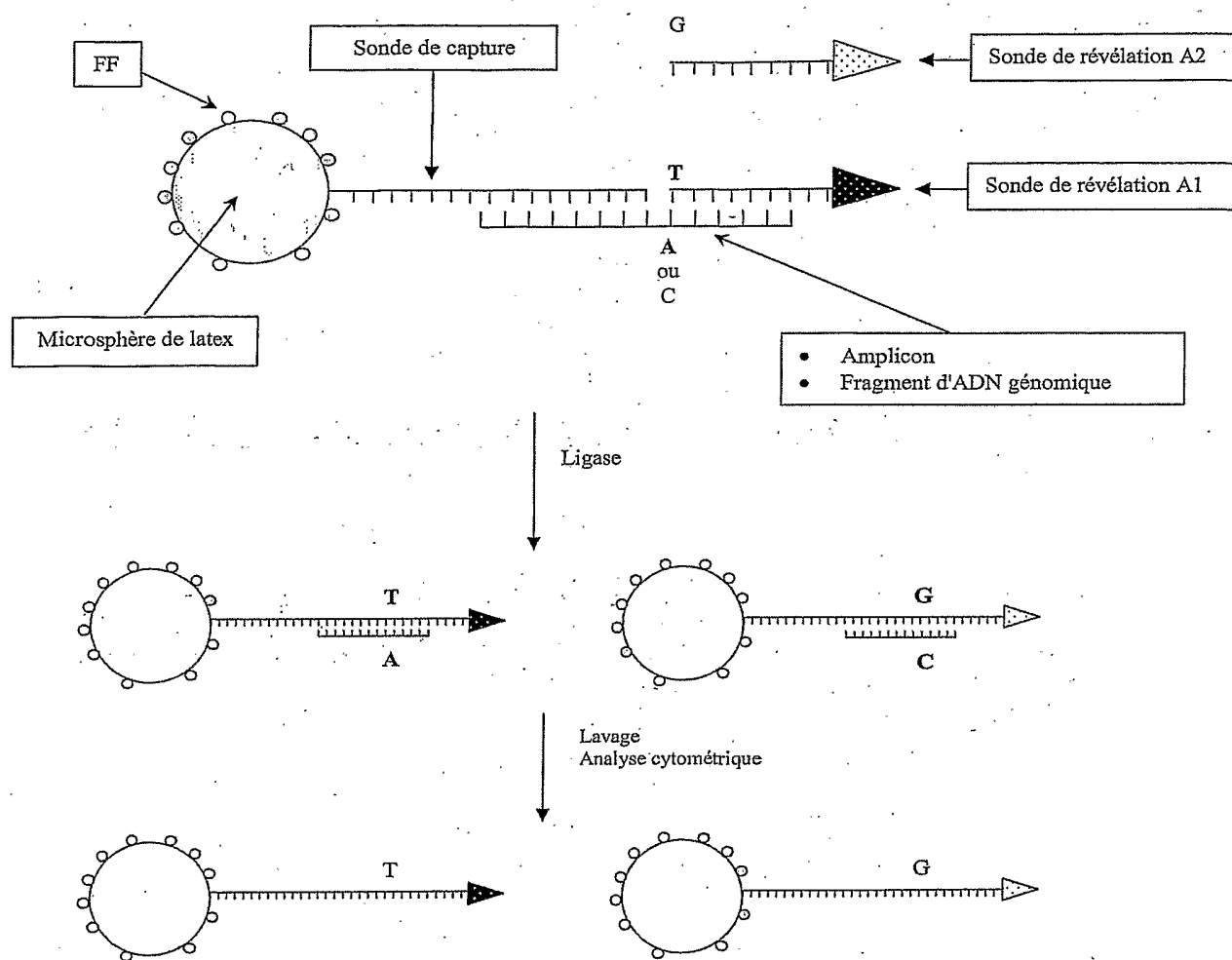
13/22



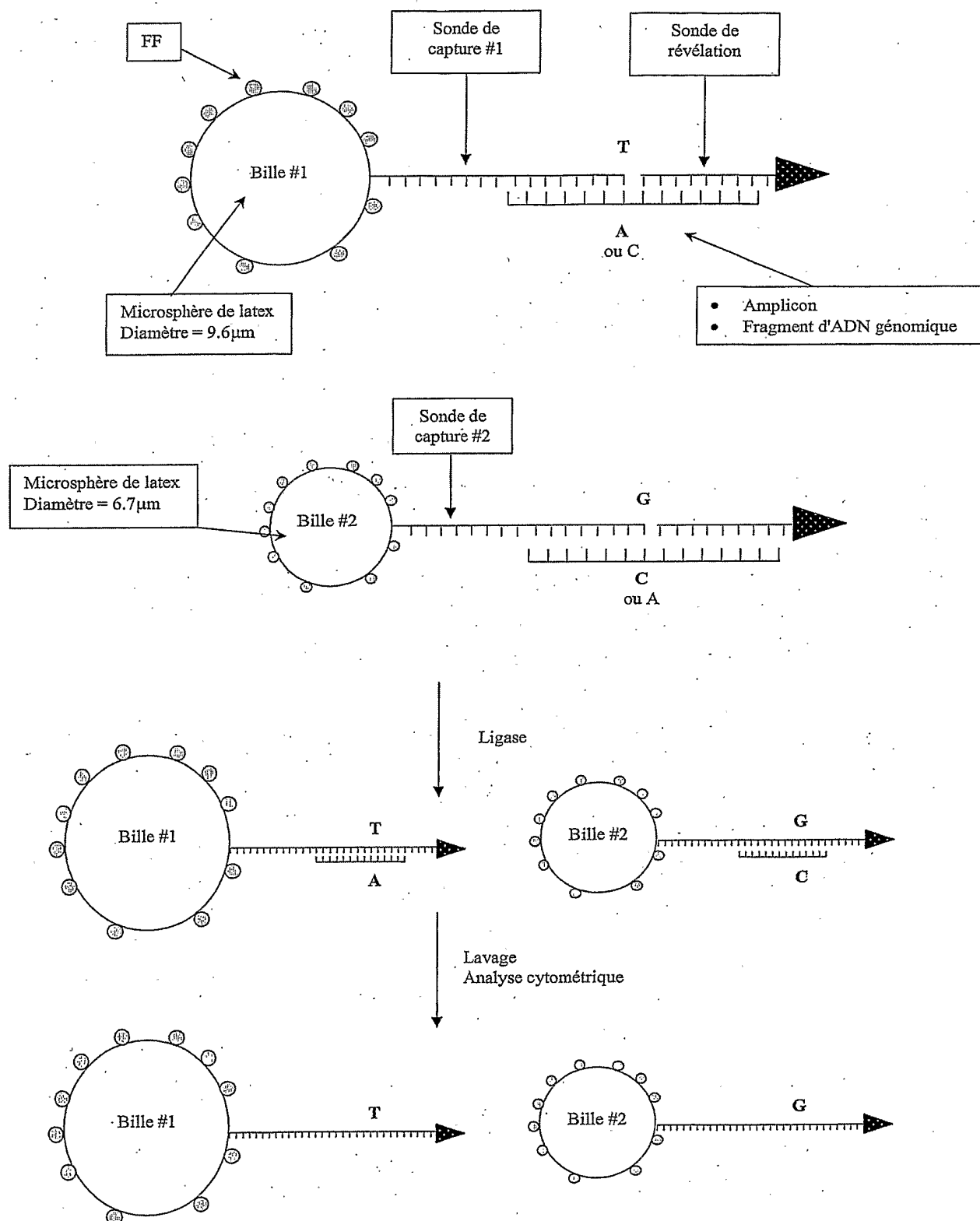
M1 = 11 et M2 = 77

Figure 19

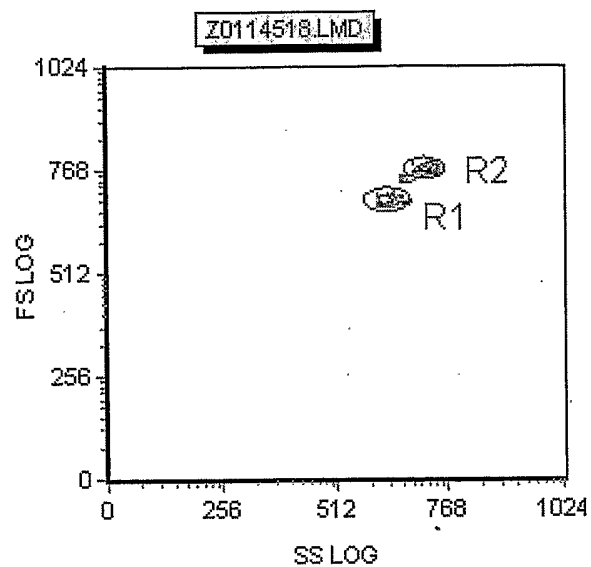
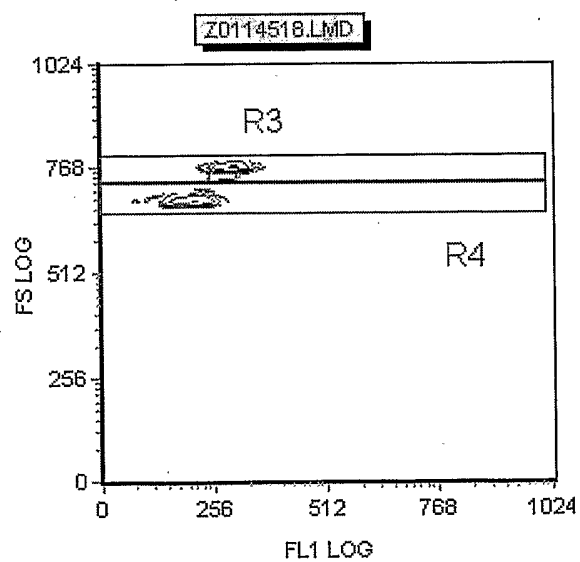
14/22

**Figure 20**

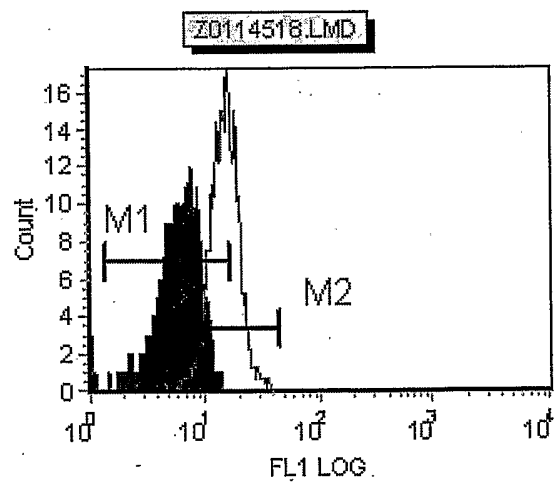
15/22

**Figure 21**

16/22

**Figure 22**

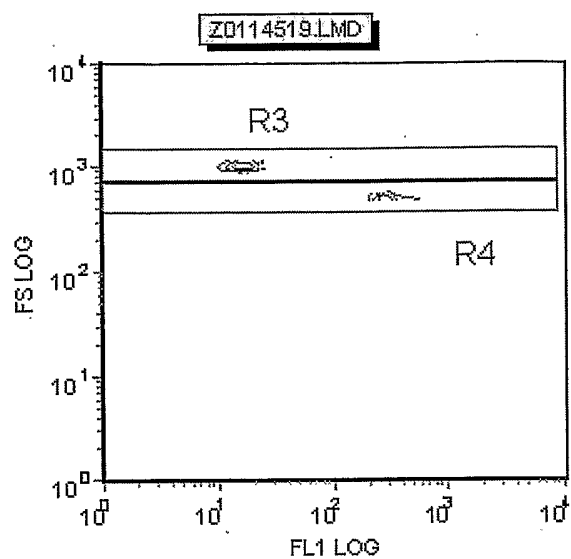
(μ SFV wt + μ SFV mut) + PCR P2Y12

Figure 23

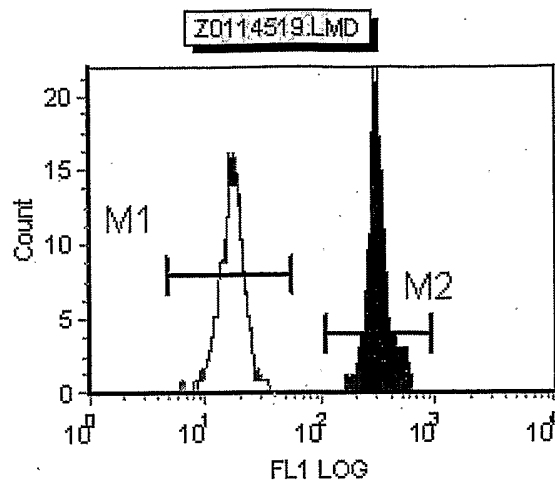
M1 = 6 et M2 = 15,3

Figure 24

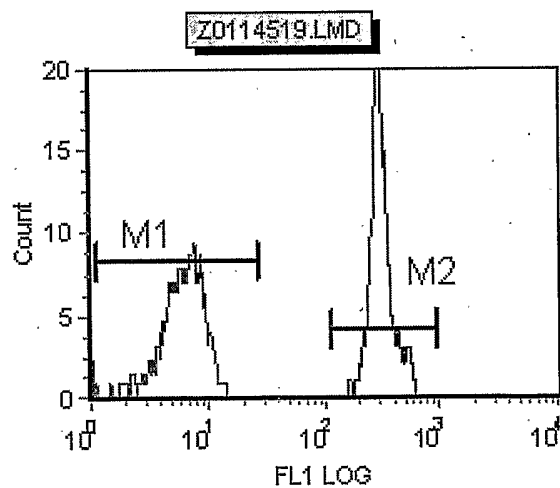
17/22



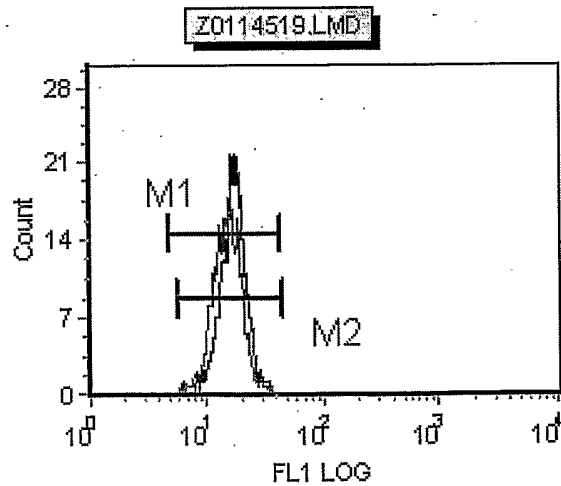
(μ SVF wt + μ SVF mut) + PCR FV wt

Figure 25

M1 = 17,4 et M2 = 313 FV mut vs FV wt

Figure 26

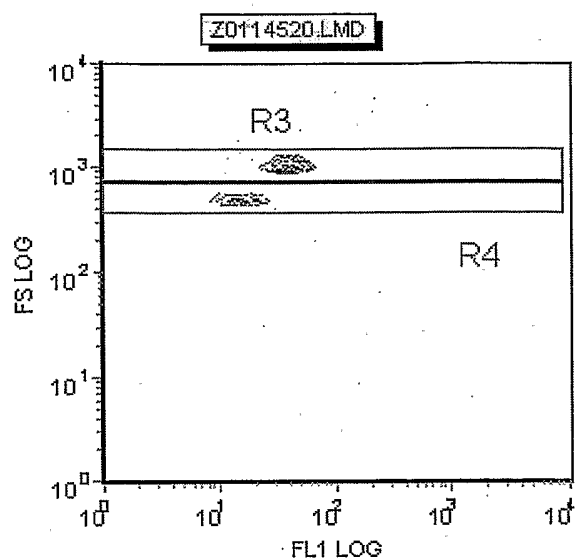
M1 = 6,0 et M2 = 313 BF vs Test

Figure 27

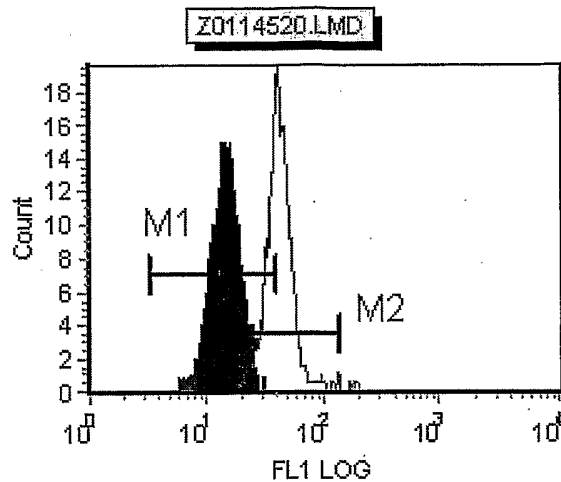
M1 = 15,3 et M2 = 17,4 BF vs Test

Figure 28

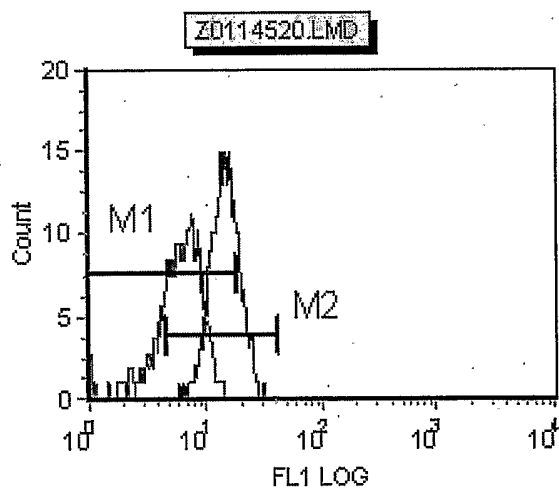
18/22



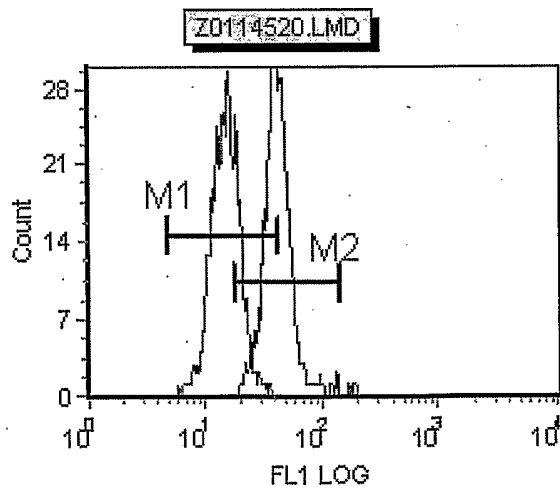
(μSFV wt + μSFV mut) + PCR FV wt

Figure 29

M1 = 14,8 et M2 = 43,4 FV mut vs FV wt

Figure 30

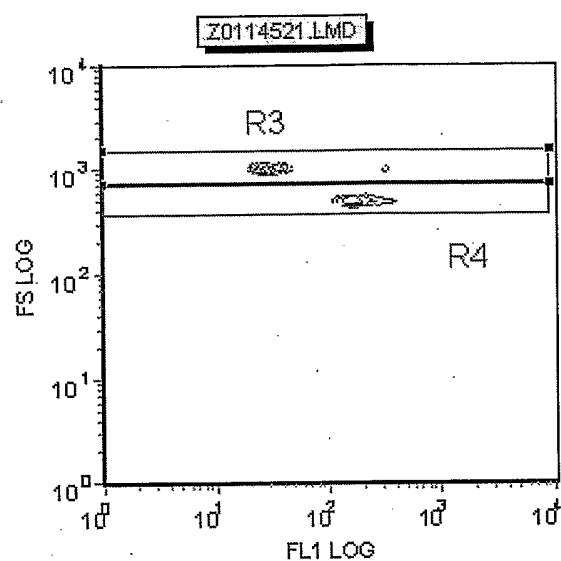
M1 = 6 et M2 = 14,8 BF vs Test

Figure 31

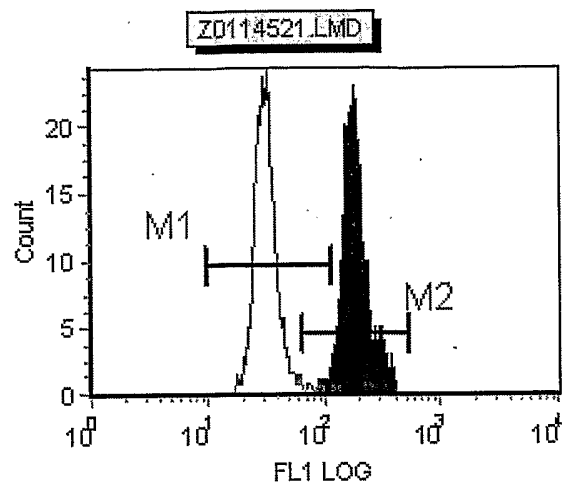
M1 = 15,3 et M2 = 43,4 BF vs Test

Figure 32

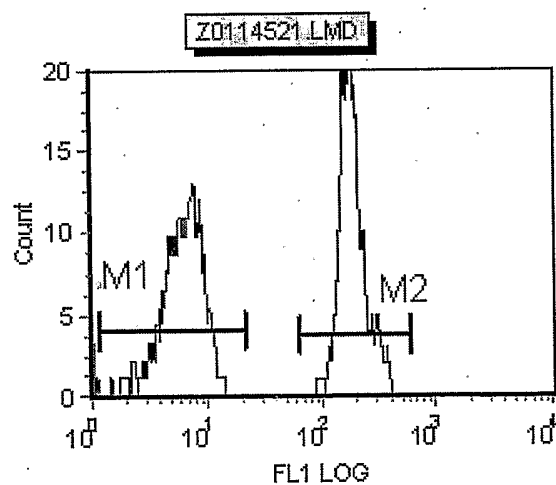
19/22



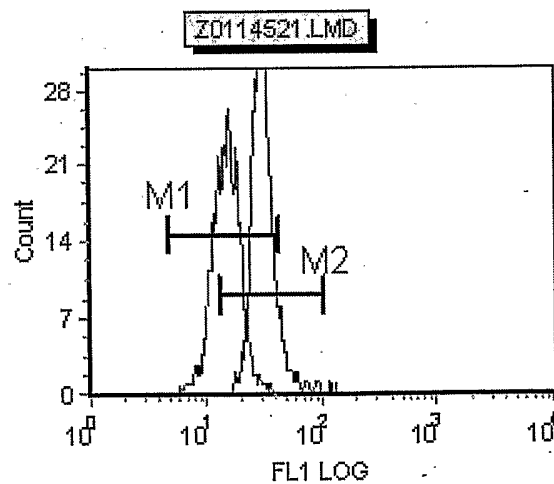
(μ SFV wt + μ SFV mut) + PCR FV wt

Figure 33

M1 = 33 et M2 = 187 FV mut vs FV wt

Figure 34

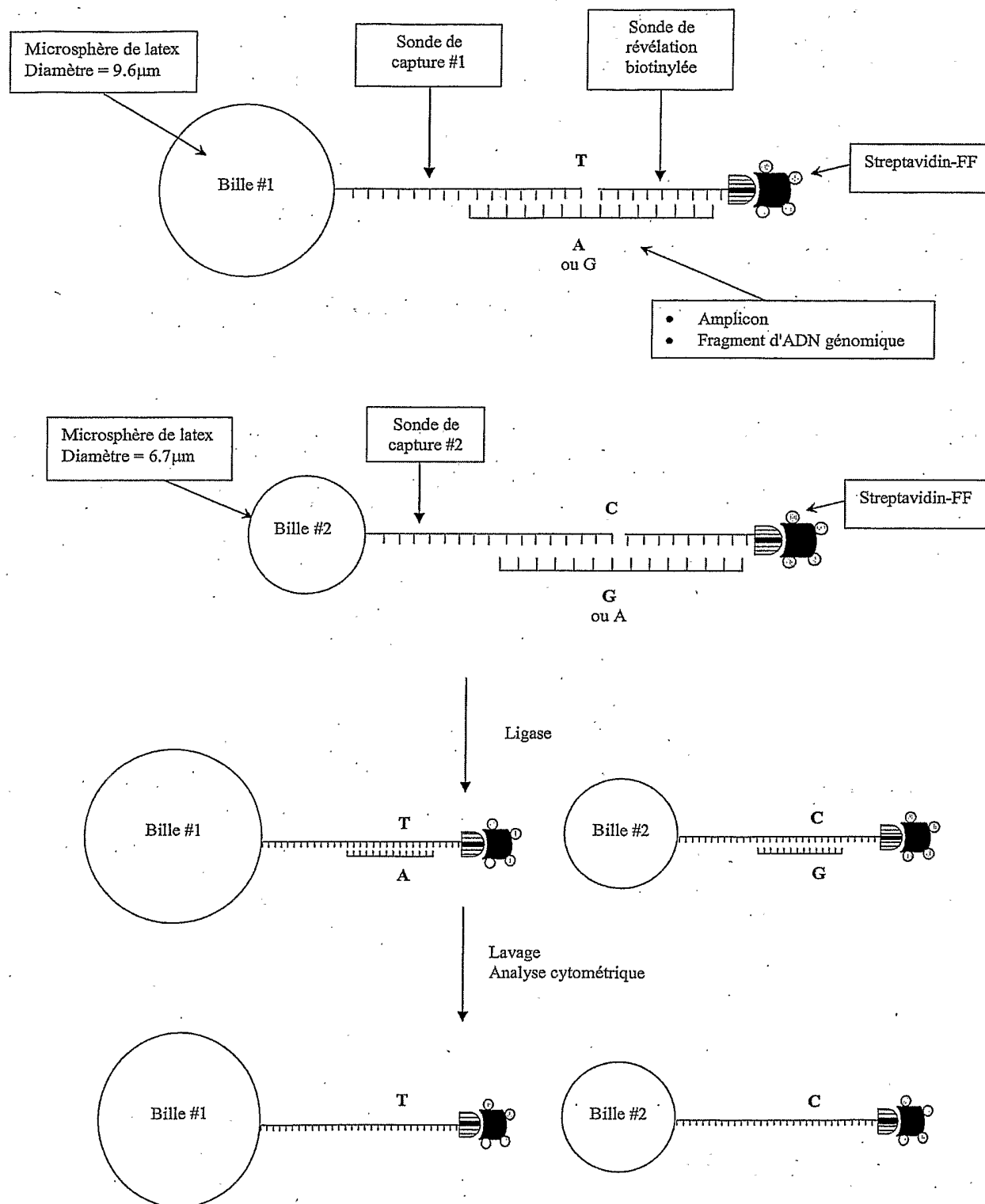
M1 = 6 et M2 = 187 BF vs Test

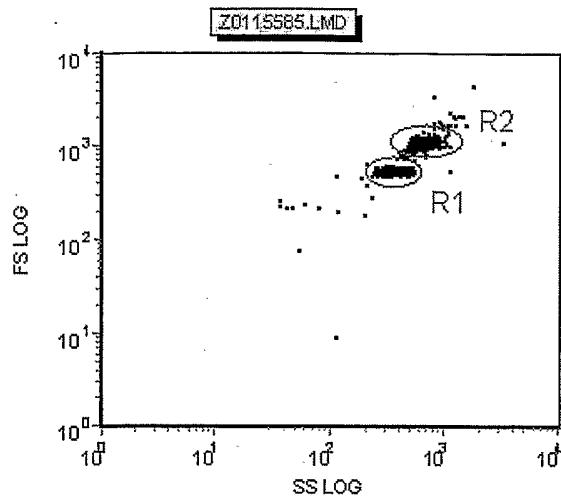
Figure 35

M1 = 15,3 et M2 = 33 BF vs Test

Figure 36

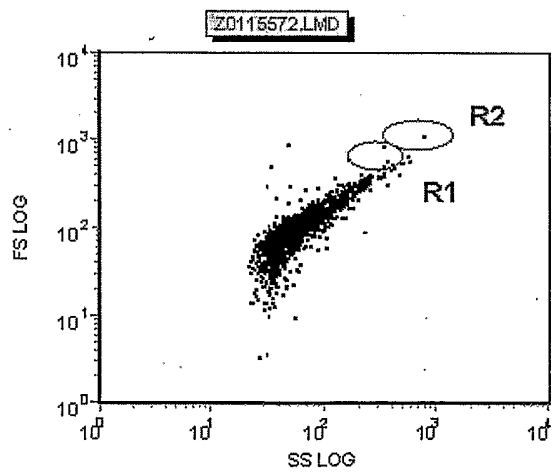
20/22

**Figure 37**



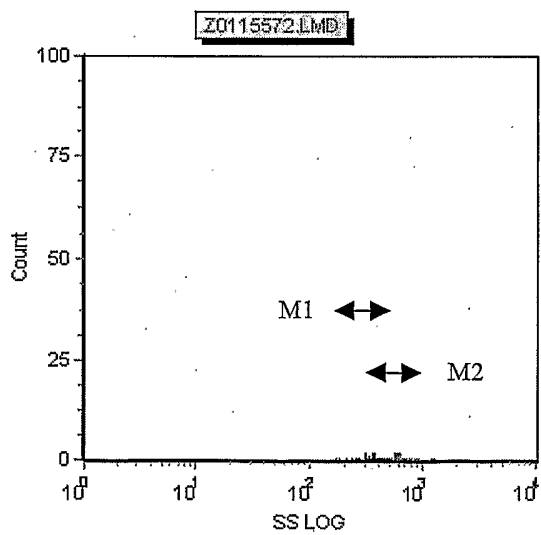
(μ SFVwt + μ SFVmut)

Figure 38



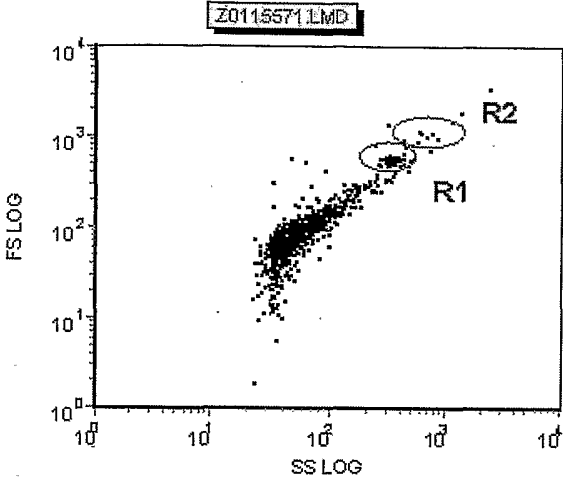
(μ SFVwt + μ SFVmut) + PCR P2Y12

Figure 39



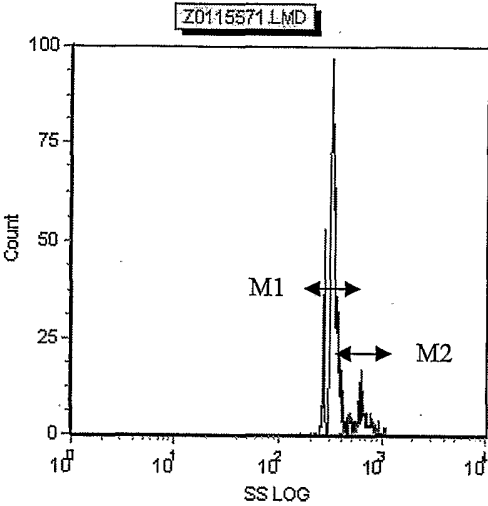
Nombre μ S FVwt = 125; FVmut = 15

Figure 40



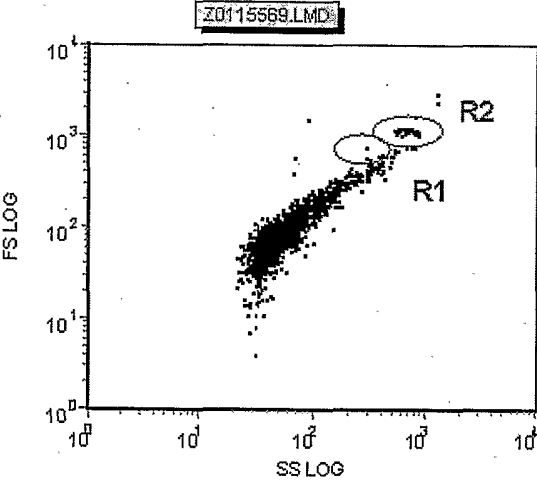
(μ SVF wt + μ SVF mut) + PCR FV wt

Figure 41



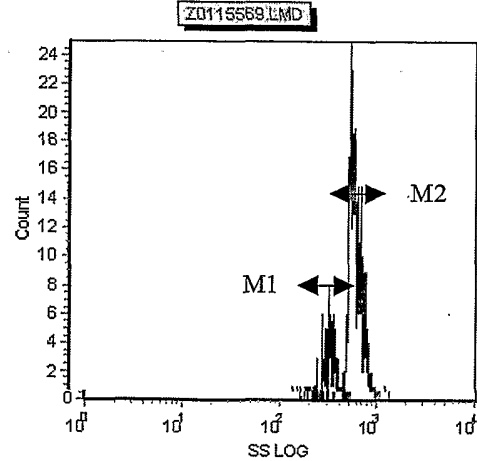
Nombre μ S FVwt = 2222; FVmut = 294

Figure 42



(μ SVF wt + μ SVF mut) + PCR FV mut

Figure 43



Nombre μ S FVwt = 32; FVmut = 600

Figure 44

LISTE DE SEQUENCES

<110> BIOCYTEX

<120> Dosage multiplex

<130> D21243

<150> FR 03/06 354

<151> 2003-05-26

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 34

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Sonde de capture

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(1)

<223> /note="espaceur comprenant un groupement amine et une chaîne carbonée à 6 carbones"

<400> 1

tttttttttt ttggacaaaa tacctgtatt cctc

34

<210> 2

<211> 37

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Sonde de capture

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(1)

<223> /note="espaceur comprenant un groupement amine et une chaîne carbonée à 6 carbones"

<400> 2

tttttttttt ttaatagcac tgggagcatt gaggctc

37

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide synthétique

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(1)
<223> /note="espaceur comprenant un groupement amine et une chaîne carbonée à 6 carbones"

<220>
<221> modified_base
<222> (30)..(30)
<223> /mod_base= Thymine
/note="biotine fixée sur T"

<400> 3
tttttttttt tttttttttt tttttttttt

30

<210> 4
<211> 22
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde de capture

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> /mod_base= Guanine
/note="fluorescéine fixée sur G"

<400> 4
gaggaataca ggtattttgt cc

22

<210> 5
<211> 25
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde de capture

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> /mod_base= Guanine
/note= "fluorescéine fixée sur G"

<400> 5
gagcctcaat gctcccagtg ctatt

25

<210> 6
<211> 34
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde de capture

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)..(1)

<223> /note="espaceur comprenant un groupement amine et une chaîne carbonée à 6 carbones"

<400> 6

tttttttttt ttggacaaaa tacctgtatt cctt

34

<210> 7

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Sonde de capture

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> /mod_base= Guanine

/note="groupement phosphate sur G"

<220>

<221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> /mod_base= Cytidine

/note="fluorescéine fixée sur C"

<400> 7

gcctgtccag ggatctgctc c

21

<210> 8

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Sonde de révélation

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> /mod_base= Guanine

/note="groupement phosphate sur G"

<220>

<221> modified_base

<222> (39)..(39)

<223> /mod_base= Thymine

/note="biotine fixée sur T"

<400> 8

gcctgtccag ggatctgctc cttttttttt tttttttt

39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

P2004/001307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2001/054580 A1 (EDWARDS RICHARD B ET AL) 27 December 2001 (2001-12-27) cited in the application abstract; claims	21-24
Y	-----	1-20
Y	US 5 998 224 A (HOWARD LAWRENCE V ET AL) 7 December 1999 (1999-12-07) cited in the application claim 23; figure 1 ----- -/--	1-20



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 2004

Date of mailing of the international search report

27/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stricker, J-E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
FR2004/001307

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FUJIMURA NAOKO ET AL: "Rapid multiplex single nucleotide polymorphism genotyping based on single base extension reactions and color-coded beads." JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, vol. 94, no. 4, 2002, pages 368-370, XP002300352 ISSN: 1389-1723 the whole document figure 1	19
Y	SHAPERO M H ET AL: "SNP genotyping by multiplexed solid-phase amplification and fluorescent minisequencing" GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, vol. 11, no. 11, 2001, pages 1926-1934, XP002252459 ISSN: 1088-9051 the whole document	19
Y	US 4 988 617 A (LANDEGREN ULF ET AL) 29 January 1991 (1991-01-29) cited in the application the whole document	20
P,Y	YINGYONGNARONGKUL B ET AL: "PARALLEL AND MULTIPLEXED BEAD-BASED ASSAYS AND ENCODING STRATEGIES" COMBINATORIAL CHEMISTRY AND HIGH THROUGHPUT SCREENING, HILVERSUM, NL, vol. 6, no. 7, November 2003 (2003-11), pages 577-587, XP009027987 ISSN: 1386-2073 abstract Chapitre 5.1.2.4	19
P,A	LIZARD G ET AL: "Microbeads, nanobeads and cytometry: Applications to the analysis and purification of cells and biomolecules." PATHOLOGIE BIOLOGIE, vol. 51, no. 7, September 2003 (2003-09), pages 418-427, XP002300353 ISSN: 0369-8114 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
/FR2004/001307

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2001054580	A1	27-12-2001	US 2001008217 A1 19-07-2001
			US 2004126904 A1 01-07-2004
			AU 1203199 A 07-06-1999
			CA 2260991 A1 18-05-1999
			DE 69812329 D1 24-04-2003
			DE 69812329 T2 12-02-2004
			EP 1248110 A2 09-10-2002
			EP 0965044 A1 22-12-1999
			JP 2000516345 T 05-12-2000
			WO 9926067 A1 27-05-1999
US 5998224	A	07-12-1999	CA 2290018 A1 19-11-1998
			EP 0981749 A1 01-03-2000
			JP 2002504993 T 12-02-2002
			WO 9852043 A1 19-11-1998
US 4988617	A	29-01-1991	NONE

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de Internationale No
'FR2004/001307A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 2001/054580 A1 (EDWARDS RICHARD B ET AL) 27 décembre 2001 (2001-12-27) cité dans la demande abrége; revendications	21-24
Y	-----	1-20
Y	US 5 998 224 A (HOWARD LAWRENCE V ET AL) 7 décembre 1999 (1999-12-07) cité dans la demande revendication 23; figure 1 ----- -/--	1-20



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 octobre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/10/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Stricker, J-E

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FUJIMURA NAOKO ET AL: "Rapid multiplex single nucleotide polymorphism genotyping based on single base extension reactions and color-coded beads." JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, vol. 94, no. 4, 2002, pages 368-370, XP002300352 ISSN: 1389-1723 le document en entier figure 1	19
Y	SHAPERO M H ET AL: "SNP genotyping by multiplexed solid-phase amplification and fluorescent minisequencing" GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, vol. 11, no. 11, 2001, pages 1926-1934, XP002252459 ISSN: 1088-9051 le document en entier	19
Y	US 4 988 617 A (LANDEGREN ULF ET AL) 29 janvier 1991 (1991-01-29) cité dans la demande le document en entier	20
P,Y	YINGYONGNARONGKUL B ET AL: "PARALLEL AND MULTIPLEXED BEAD-BASED ASSAYS AND ENCODING STRATEGIES" COMBINATORIAL CHEMISTRY AND HIGH THROUGHPUT SCREENING, HILVERSUM, NL, vol. 6, no. 7, novembre 2003 (2003-11), pages 577-587, XP009027987 ISSN: 1386-2073 abrégé Chapitre 5.1.2.4	19
P,A	LIZARD G ET AL: "Microbeads, nanobeads and cytometry: Applications to the analysis and purification of cells and biomolecules." PATHOLOGIE BIOLOGIE, vol. 51, no. 7, septembre 2003 (2003-09), pages 418-427, XP002300353 ISSN: 0369-8114 le document en entier	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de Internationale No

/FR2004/001307

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2001054580 A1	27-12-2001	US 2001008217 A1	19-07-2001
		US 2004126904 A1	01-07-2004
		AU 1203199 A	07-06-1999
		CA 2260991 A1	18-05-1999
		DE 69812329 D1	24-04-2003
		DE 69812329 T2	12-02-2004
		EP 1248110 A2	09-10-2002
		EP 0965044 A1	22-12-1999
		JP 2000516345 T	05-12-2000
		WO 9926067 A1	27-05-1999
US 5998224 A	07-12-1999	CA 2290018 A1	19-11-1998
		EP 0981749 A1	01-03-2000
		JP 2002504993 T	12-02-2002
		WO 9852043 A1	19-11-1998
US 4988617 A	29-01-1991	AUCUN	