

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
25 mai 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/36964 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: G01N 33/00

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/03219

(22) Date de dépôt international:
20 novembre 2000 (20.11.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/14688 19 novembre 1999 (19.11.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): ADI-
ATEC [FR/FR]; 1, place Alexis Ricordeau, F-44093
Nantes Cedex 1 (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement): LESSER,
Joël [FR/FR]; 11, Impasse de la Clé des Champs, F-44340
Bouguenais (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, 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, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport.

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

(54) Title: DEVICE FOR TESTING IN VIVO SAMPLES BETWEEN 1 TO 100 µL

(54) Titre: DISPOSITIF DE TEST IN VIVO POUR DES ECHANTILLONS DE 1 A 100 µL

(57) Abstract: The invention concerns a test device and the method for making same, for analysing small volumes, optionally predetermined and controlled, optionally in vivo, by chromatographic immunoassay processes. The use of a volumetric control and the reduced size of some of the components of said device enable to perform non-invasive in vivo analyses, for example on tear drops, secretions, perspiration and any naturally or spontaneously accessible liquid. The inventive testing device enables to analyse samples having a volume less than 100 µl. It also enables to control the analysed volume for quantitative analysis of the results. Said testing device is useful, for example but not exclusively, for detecting in vivo various specific elements in a biological sample. The invention also concerns the use of said testing device in analysis kits.

(57) Abrégé: L'invention concerne un dispositif de test et sa production, pour l'analyse sur des petits volumes, éventuellement déterminés et contrôlés, éventuellement in vivo, par des méthodes immunochromatographiques. L'utilisation d'un témoin volumétrique et la taille réduite de certains des composants de ce dispositif permet d'effectuer des analyses in vivo non invasives, par exemple sur des larmes, des sécrétions, la sueur et tout liquide naturellement ou spontanément accessibles. Le dispositif de test décrit dans la présente invention permet l'analyse d'échantillon de volume inférieur à 100 µl. Il permet également le contrôle du volume analysé pour l'analyse quantitative des résultats. Ce dispositif de test est applicable par exemple et de façon non limitative à la détection in vivo de différents éléments spécifiques dans un échantillon biologique. L'utilisation de ce dispositif de test dans des trousses d'analyse est incluse.

WO 01/36964 A2

DISPOSITIF DE TEST IN VIVO POUR DES ECHANTILLONS DE 1 A 100 UL

CHAMPS D'APPLICATION

Cette invention concerne l'immuno - analyse, l'analyse par immunochromatographie, les dispositifs de tests utilisant des réactifs pour les immuno - essais, et les méthodes en une étape pour effectuer des analyses d'échantillons liquides suspectés de contenir des

5 ligands. En particulier, cette invention concerne les dispositifs d'analyse qui sont adaptés à un usage unitaire, à domicile, en milieu hospitalier ou en cabinet médical, et qui sont destinés à donner un résultat analytique rapide et demandant le minimum d'habileté, de pratique, et présentant le minimum de difficultés pour un utilisateur inexpérimenté.

Il s'agit de protéger un dispositif de test original permettant d'utiliser les méthodes

10 immunochromatographiques avec de très faibles volumes d'échantillon sans diminuer la sensibilité de l'analyse.

Cette invention permet d'obtenir des résultats avec des échantillons dont le volume est très faible, de l'ordre du μ l à quelques dizaines de μ l, en utilisant l'immunochromatographie ou migration latérale, tout en calibrant le volume

15 d'échantillon analysé.

Elle permet également le prélèvement in vivo de l'échantillon et sa mise en contact avec le dispositif d'analyse.

Elle permet aussi de déterminer et contrôler le volume d'échantillon analysé.

ETAT DE L'ART

20 Les analyses utilisant l'affinité spécifique de réactifs ont montré leur grande utilité ces dernières années, tant dans le domaine de l'analyse biologique que pour d'autres applications. Plusieurs techniques, dites d'immuno - analyse, utilisent ainsi l'affinité spécifique existant entre deux ou plusieurs réactifs: il s'agit de la technique 'sandwich', et de la compétition.

25 Ces méthodes utilisent un ou les deux membres de couple(s) d'affinité spécifique pour la détection et la détermination d'un ou plusieurs élément(s).

Toutes ces techniques ont la caractéristique d'utiliser un réactif fixé sur un support et un réactif de révélation libre. Selon la nature du test, le réactif fixé sur le support peut être un anticorps, un antigène ou toute substance membre d'un couple d'affinité spécifique.

30 De même pour le réactif de révélation, qui présente de plus la particularité de ne pas être fixé à un support mais d'être composé au moins en partie d'une molécule indicatrice ou pouvant donné lieu à une réaction indicatrice. Les marqueurs les plus couramment utilisés sont les colorants, les substances radioactives, les enzymes, les colloïdes d'or et les billes de latex.

35 De nombreuses formes de supports solides sur lequel un des membres d'un couple d'affinité est fixé, ont été décrits. Actuellement, les supports les plus courants pour les RIA et les ELISA sont des tubes, plaques ou billes de polystyrène. Mais des filtres de papier, du verre et diverses matières plastiques ont été utilisé pendant longtemps.

Les essais radio-immunologiques (RIA) et enzymatiques (EIA) sont connus et utilisés dans le monde entier. Plus récemment développés, les tests immunochromatographiques ont pris et continuent à prendre une place de plus en plus importante dans le domaine du diagnostic. Ces tests utilisent principalement des membranes de diverses natures et compositions comme support solide.

Le développement de marqueurs non radioactifs et non enzymatiques ont facilité l'usage des procédures immunologiques de diagnostic en dehors des laboratoires spécialisés, jusqu'au cabinet du médecin et même au domicile des patients. Ces procédures doivent être rapides et simples, apportant presque instantanément une aide au diagnostic. Le développement de tels tests s'est donc concentré, outre la nécessité d'une sensibilité et d'une spécificité appropriées, sur l'amélioration de trois caractéristiques principales: la rapidité, la stabilité (à température ambiante), et la facilité d'emploi et de lecture des résultats.

Dans *Immunochemistry - Practical applications in pathology and biology* (eds Polak J.M et Van Noorden S., 1986), il est décrit la préparation et l'utilisation d'or comme marqueur coloré. L'absorption d'une substance réactive sur des colloïdes d'or est décrite par Geoghegan W. et Ackerman G. dans *J. Histochem. Cytochem.* (1977), 25, 1187. L'utilisation des colloïdes d'or pour la visualisation de réactions antigène - anticorps dans des analyses utilisant le dépôt de réactifs immunologiques sur des membranes est décrit par Moeremans M. et coll. dans *J. Immunol. Meth.* (1984), 74, 353.

Les méthodes d'analyse immunochromatographique utilisent un support d'immunochromatographie à travers lequel va diffuser l'échantillon, soit de manière latérale et on parle de migration, soit de façon transversale et on parle alors de filtration. Dans le cas des tests d'immunochromatographie par migration, les colloïdes d'or et les billes de latex sont généralement utilisés pour la révélation optique (colorée) du résultat, en tant que composants du réactif de révélation ou de coloration. Mais sont également utilisées des enzymes dont la réaction avec un substrat produit directement ou indirectement une coloration associée à un produit coloré insoluble.

Selon la technique sandwich qui utilisent deux ligands de la molécule recherchée, un des ligands est fixé et l'autre couplé avec un indicateur permettant la visualisation du résultat, par coloration directe lorsqu'il s'agit d'une substance colorée ou par l'apparition d'une coloration après une réaction enzymologique lorsqu'il s'agit d'une enzyme. Selon la technique de compétition, un seul ligand est utilisé ainsi que la substance recherchée ou son analogue; le ligand est alors fixé ou libre et couplé avec l'indicateur coloré ou enzymatique, la substance recherchée ou son analogue étant inversement fixé ou couplé.

L'immunochromatographie a fait l'objet de nombreux dépôts de brevets dont EP 0 306 772 et EP 0 262 328 d'Abbott (marque déposée), EP 0 286 371 et EP 0 183 442 de Syntex (marque déposée), EP 0 276 152 de Synbiotics Corporation (marque déposée), EP 0 296 724 de Quidel (marque déposée) et WO 88/00322 d'Unilever (marque déposée).

On peut également cité les brevets US 4. 366.241 de Tom et al., US n° 4.632.901 de Valkirs et al., US 4.522.923 de Deutsch A. et Platt H.A., WO 8606488 de Barnett B., EP 0 022 669 de Graham H.A. et coll., US 4. 094.647, 4. 235.601 et 4. 361.537 de Deutsch M.E. et Mead L.W., FR 2537724 de Friedenberg R.M., EP 0206779 de Lipp V. et Buck R.L., EP 0189925 de Deutsch A. et coll., WO 84/02397 de Friedenberg, US 3. 893.808 de Campbell, et US 3.895.914 d'Alberty et coll.

Hochstrasser (brevet U.S. 4.059.407) révèle un dispositif de test à bandelette qui peut être immergé dans un fluide biologique pour la semi - quantification d'un analyte dans le fluide.

- 10 Dans le domaine du dosage par bandelette, sont également intéressant les brevets U.S. 3.802.842, 3.915.639 et 4.689.309.

Dans des analyses de type migration, une membrane est imbibée des réactifs requis pour exécuter l'analyse. L'analyte marqué est capturé dans une zone de détection incluse dans la membrane et où le résultat de l'analyse est lu. Voir, par exemple, Tom et coll., brevet 15 U.S. 4.366.241, et Zuk, EP-A 0 143 574. L'utilisation de bandelettes d'analyse imbibées de réactif pour des analyses de captures spécifiques, telles que des immuno - essais, a été proposée dans les brevets EP 0225054, EP 0183442 , EP 0186799, et GB 1589234. Dans de telles procédures, un échantillon est appliqué à une partie de la bandelette d'analyse et imprègne la bandelette, habituellement à l'aide d'une solution d'élution tel que l'eau. Ce 20 faisant, l'échantillon progresse à travers une zone de détection dans la bandelette, où est immobilisé un réactif de capture spécifique de l'analyte suspecté d'être dans l'échantillon. L'analyte présent dans l'échantillon peut donc être capturé dans la zone de détection. La façon dont l'analyte est capturé peut être déterminée à l'aide de réactifs marqués qui peuvent également être incorporés dans la bandelette ou être appliqués dessus 25 ultérieurement.

Korom et coll., EP 0 299 359, décrivent une modification de dispositif de test dans lequel l'anticorps marqué est incorporé dans une membrane qui agit comme un système délivrant le réactif.

- 30 Grubb et coll, brevet U.S. 4.168.146) décrivent l'utilisation d'un matériel poreux de bandelette d'analyse auquel est lié de façon covalente un anticorps spécifique d'un antigène.

Weng et coll. dans le brevet U.S. 4.740.468 décrivent un dispositif chromatographique de test en bandelette comprenant une bande absorbante ayant une partie terminale devant entrer en contact avec l'échantillon. Une région d'analyse est à distance de la partie 35 terminale et contient un dépôt d'anticorps immobilisé et spécifique de l'analyte. La bandelette inclut également une zone de capture du marqueur non liée incluant un analogue immobilisé de l'analyte. Lors de l'utilisation, une solution d'analyse est préparée en mélangeant l'échantillon du patient à un premier membre d'une paire de

ligands spécifiques, par exemple, un conjugué d'anticorps marqué spécifique pour l'analyse.

L'immunochromatographie sur bandelette contenant un conjugué immunoréactif particulière est décrite dans le brevet Rosenstein EP 284 232 de Becton Dickinson (marque déposée).

Dans la méthode d'analyse en bandelette, le dispositif d'analyse est une bandelette sur laquelle un ligand immunologique est fixé. La bandelette est plongée dans ou autrement mise en contact avec l'échantillon, puis successivement mise en contact une ou plusieurs solutions différentes qui peuvent contenir un anti - ligand marqué, un substrat d'enzymes (pour des marquages enzymatiques) et/ou des solutions de lavage pour retirer n'importe quel marqueur non capturé. Une étape de filtration peut également être effectuée pour faciliter le lavage complet (voir, par exemple, le brevet U.S. 4.623.461). D'autres chercheurs ont suggéré l'utilisation d'un deuxième contrôle de l'analyse pour la vérification des résultats. Voir, par exemple, le brevet U.S. 4.200.690: méthode donnée pour l'analyse d'échantillons fécaux, utilisant deux lavages et étapes d'incubation.

L'immunochromatographe (bandelette) sous étui plastique à deux fenêtres: puits échantillon et fenêtre de lecture, est décrit dans le brevet EP 291 194 d'Unilever (marque déposée).

D'autres brevets concernent le réactif de révélation utilisé, comme les brevets Leuvering d'Akzona EP 7654 (US 4 313 734), EP 398 913 (WO 89/06801) de Nycomed (marque déposée), EP 0 250 137 et 0 258 963 d'Ortho Diagnostic System (marque déposée), EP 0 158 746 et 0 293 947 de Janssen Pharmaceutica (marque déposée), et EP 0 310 872 d'Hygeia Sciences, pour l'utilisation de colloïdes d'or, les brevets pour l'utilisation de billes de latex étant également nombreux (US N°4.434.150, N°31.712, N° 4.478.914, N° 4.141.965, N° 4.210.622, N°4.331.649, N° 4.582.810). On peut aussi citer les brevets US N°4.803.154, N°4.446.232, N°4.752.572 pour la révélation enzymatique et l'utilisation d'un ligand couplé à une enzyme.

Ces brevets concernent des dispositifs, méthodes et applications permettant de procéder à la détection d'un élément, et donc conduisant à l'obtention d'un résultat indiquant la présence ou l'absence dudit élément dans un échantillon.

Les méthodes immunochromatographiques sont principalement utilisées dans des tests unitaires permettant l'analyse rapide d'un seul échantillon. Ces tests présentent le résultat de l'analyse sous la forme d'un spot ou d'une ligne visible ou invisible selon le résultat après un temps généralement inférieur à 20 minutes. La validité du résultat est généralement assurée par un contrôle de fonctionnement interne.

Sur le même test, on obtient donc le résultat de l'analyse et le résultat du contrôle de fonctionnement. Ces résultats, de nature généralement qualitative et à lecture le plus souvent visuelle, se présentent sous forme de lignes, points ou caractères colorés, par exemple de couleur rouge pour les tests utilisant l'or colloïdal.

Généralement ces tests utilisent la capture directe du réactif de révélation (complexe composé d'une substance affine et d'un indicateur coloré ou d'une enzyme) pour le contrôle du fonctionnement du test. Dans le but d'assurer l'utilisateur du fonctionnement correct du test, le signal est généralement prévu pour avoir une intensité maximale, et donc une visibilité optimale.

Ces dispositifs demandent souvent un volume d'échantillon d'environ 200 µl. Parfois, elles n'utilisent qu'un plus faible volume d'échantillon prélevé mais celui-ci est alors dilué de façon à obtenir un volume final supérieur à 100 µl. Il est évident que ce dernier cas entraîne une perte de sensibilité liée à la dilution.

Cependant, il est parfois utile ou nécessaire d'effectuer des analyses sur des échantillons dont le volume est très faible, dont le prélèvement peut être délicat et dont la dilution empêche d'avoir une sensibilité suffisante.

La sensibilité de tels tests est en effet limitée par le volume d'échantillon diffusant dans la bandelette.

Ces dispositifs, à l'exception des tests unitaires munis d'une mèche décrits dans certains brevets précédemment cités, sont destinés à des analyses in vitro. Le prélèvement de l'échantillon doit être effectué auparavant et indépendamment de ces dispositifs. L'échantillon, éventuellement extrait et traité, est ensuite mis en contact, pur ou dilué, avec le dispositif de test par le filtre ou la mèche.

Cependant les petits volumes sont difficilement à manipuler, et leur manipulation entraîne une perte de leur volume et un risque de contamination de l'échantillon mais surtout du manipulateur. De plus, dans certains cas, le prélèvement de l'échantillon peut s'avérer délicat, soit par le lieu de prélèvement qui peut être un tissu délicat ou par exemple une muqueuse sensible, soit par son volume très faible.

Il est dans ces deux cas: prélèvement délicat et faible volume, préférable de procéder à une analyse in vivo, c'est à dire de mettre directement en contact le dispositif de test avec le tissu que l'on veut analyser, ce qui permet d'éviter tout prélèvement et toute manipulation d'échantillon.

INTRODUCTION

La présente invention est un dispositif de test original qui permet de détecter un ou plusieurs analytes dans des volumes très faible, de l'ordre du millionième de litre (µl), avec une sensibilité égale ou voisine de celle obtenue pour des volumes usuels. Il peut permettre aussi d'effectuer le prélèvement direct de l'échantillon in vivo. L'analyse est alors faite in vivo.

L'invention décrit également un dispositif et une méthode de calibrage du volume d'échantillon utilisé pour l'analyse, et indiquant que le volume minimum nécessaire d'échantillon a bien été prélevé par le dispositif.

Les méthodes immunochromatographiques auxquelles s'applique la présente invention, sont caractérisées par le fait qu'elles ont pour objet la détection et éventuellement la détermination d'un analyte dans un échantillon. Elles peuvent comprendre ou non au moins un contrôle interne de fonctionnement ou témoin de fonctionnement, qui peut être

5 utilisé dans la présente invention pour le calibrage du volume d'échantillon.

En particulier, ce dispositif de test original a pour finalité de permettre la détection d'analyte(s) dans des échantillons de faible volume avec les tests d'immunochromatographie par migration sur membrane, utilisant un indicateur visuel coloré, qui peut être de l'or colloïdal, des billes de latex, toute substance particulaire ou

10 non, ou le produit d'une ou plusieurs réactions enzymologiques, et donnant une coloration pour l'indication du résultat.

Le dispositif de test, faisant appel à une méthodologie précise et aux techniques précédemment citées, permet premièrement la mise en contact directe d'échantillons de faibles volumes avec un dispositif d'analyse immuno - chromatographique,

15 deuxièmement de réduire le volume d'échantillon nécessaire à de telles analyses, troisièmement d'indiquer à l'exécutant de ces tests que ce volume minimal nécessaire à l'analyse a bien été prélevé par lesdits tests. Par faibles volumes, on entend des volumes compris entre 0 et 100 µl.

DESCRIPTION

20 Le dispositif de test de la présente invention fait appel aux concepts utilisés dans les dosages immunologiques en phase hétérogène, et aux principes de la mécanique des fluides, de la physique des matériaux, de la chromatographie, et de l'immunofixation.

Il fait en particulier appel à la notion de volume mort des matériaux. On appelle volume mort, le volume de solution que peut contenir le dispositif, à l'exclusion des parties en

25 aval du système d'analyse et de contrôle, principalement l'absorbant.

Dans le cadre de la présente invention, on définira le volume mort d'analyse comme le volume minimal d'échantillon nécessaire à l'obtention de résultats d'analyse valides.

L'invention présente a pour objet la diminution du volume mort d'analyse, le prélèvement d'un volume d'échantillon égal ou supérieur à celui-ci et inférieur ou égal à

30 100 µl et sa mise en contact avec le dispositif d'analyse, son utilisation pour l'analyse désirée, ainsi que le calibrage du volume d'échantillon utilisé dans toute analyse afin d'obtenir une bonne reproductibilité des résultats.

Ce dispositif de test est en particulier caractérisé par le fait que son volume mort peut être inférieur à 100 µl et même à 10 µl.

35 Les tests d'immunochromatographie latérale sont composés de 4 parties distinctes:

1. Une mèche accompagnée éventuellement d'un filtre permet de mettre en contact la bandelette avec l'échantillon tout en le filtrant. Les mèches et filtres sont généralement composé de membranes dont le matériau peut être cellulosique, ou du nylon, ou un ou

plusieurs polymères ou des fibres. La mèche a pour fonction de mettre en contact l'échantillon avec le dispositif d'analyse, le filtre a lui pour fonction d'empêcher le passage de matériaux ou particules pouvant nuire à l'analyse.

2. Une première zone réactive, appelée réservoir, composée d'une membrane prévue
5 pour recevoir un échantillon de fluide à tester et contenant une moitié de paire d'affinité spécifique du ligand recherché et couplée à un réactif permettant la mise en évidence de la présence du ligand recherché. Cette membrane est composée d'un matériau pouvant jouer le rôle de contenant (par exemple cellulose ou dérivés de cellulose, nylon, polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité par exemple, fibres
10 d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique, sous forme de poudre, de comprimés ou de couches multiples) et présentant avec ou sans traitement des propriétés de faible adsorption des molécules biologiques.

3. Une deuxième zone réactive, appelée support de la réaction, composée d'une membrane activée présentant des propriétés d'adsorption sélective de molécules (par
15 exemple par interactions ioniques, par interactions hydrophobes, par affinité, par immunoaffinité) et des propriétés de migration et de capillarité permettant à l'échantillon à tester de se déplacer et ainsi d'entraîner l'élément à doser à travers les zones réactives. Cette membrane peut ou non être composée de deux parties distinctes et contiguës ayant ou non les propriétés énoncées ci-dessus. Cette membrane peut être composé d'un ou
20 plusieurs matériaux présentant les propriétés énoncées ci-dessus (par exemple cellulose ou dérivés de cellulose, nylon, polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité par exemple, fibres d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique, sous forme de poudre, de comprimés ou de couches multiples).

On trouve dans cette partie une zone test, où les résultats concernant la détection de
25 l'analyte seront lus, une zone de contrôle de fonctionnement, et dans le cadre de l'invention présente, un témoin volumétrique.

Le témoin de fonctionnement a pour but d'indiquer que l'analyse a été effectuée correctement et que le dispositif d'analyse était bien fonctionnel lors de son utilisation. Il est généralement constitué par un ligand du réactif de révélation, ce ligand étant fixé sur
30 le support.

La capture du réactif de révélation dans la zone de contrôle de fonctionnement donne un signal qui valide donc le résultat de l'analyse.

L'apparition du signal du témoin volumétrique indique que le volume d'échantillon nécessaire et suffisant pour l'analyse a bien été prélevé par le dispositif. Ce témoin
35 volumétrique peut être ou non le contrôle de fonctionnement, utilisé alors pour ces deux fonctions.

4. Une dernière partie, appelée absorbant, dont le rôle est de provoquer et/ou de favoriser le flux à travers les deux parties précédentes. Cet élément peut être composé d'un matériau ayant des propriétés hygroscopiques (par exemple ouate de cellulose ou de

dérivés de cellulose, nylon, polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité par exemple, fibres d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique, sous forme de poudre, de comprimés ou de couches multiples).

Ces quatre parties sont placés de façon contiguë et sans discontinuité, souvent dans un module en matière plastique laissant apparaître deux secteurs de la membrane réactive par l'intermédiaire d'une fenêtre:

- . le premier secteur comprend le test montrant le résultat de l'analyse.
- . le deuxième comprend le contrôle indiquant que le test a été réalisé dans de bonnes conditions: témoin de fonctionnement. Dans le cadre de la présente invention, il peut également comprendre le témoin volumétrique.

Les trois premières parties sont généralement constituées de membranes de diverses natures (cellulose, nitrocellulose, nylon, fibres de verre etc.). Dans le dispositif de test de la présente invention, chacune de ces trois premières parties fait l'objet de modifications dont le but est de diminuer leur volume mort avec pour contraintes la conservation de la spécificité et de la sensibilité des résultats désirés.

Pour ces trois parties, il est conseillé d'utiliser de préférence et dans la mesure du possible, les membranes présentant l'épaisseur la plus fine, présentant donc un plus faible volume mort. De plus, la lecture des résultats, par nature optique quelle soit visuelle ou effectuée à l'aide d'un appareil, se fait donc à la surface du support de la réaction. Afin que les résultats soient visibles au maximum, il faut donc privilégier la surface à l'épaisseur.

Première partie: filtre et/ou mèche.

Lorsque un filtre est nécessaire, il peut faire également office de mèche afin de supprimer un volume mort supplémentaire. La longueur du filtre ou de la mèche sera fixée au minimum nécessaire pour le prélèvement de l'échantillon, moins de 5 millimètres lorsque l'analyse se fait in vitro, et de la longueur nécessaire au prélèvement pour une analyse in vivo, généralement inférieure à 10 millimètres.

La largeur du filtre ou de la mèche peut éventuellement intervenir pour sa fonction de filtration lorsque celle-ci est vitale et mise de façon importante à contribution, mais ce n'est généralement pas le cas. De plus, il est évident que plus le volume d'échantillon est faible, plus le filtre peut être petit. Quand à sa fonction de mise en contact, la diminution de sa largeur n'entraînera éventuellement qu'un ralentissement minime de l'analyse. La largeur du filtre ou de la mèche peut alors être réduite au minimum.

Pour un dispositif de test in vivo, la mèche doit être composé d'un matériau dépourvu de toute toxicité et non allergénique, d'une largeur ou d'un diamètre inférieur à 5 millimètres, d'une longueur inférieure à 10 millimètres.

La mèche d'un dispositif de test in vivo doit donc avoir une surface inférieure à 50 mm², la priorité devant être donnée à sa longueur qui doit être suffisante pour une bonne mise en contact in vivo.

Deuxième partie: le réservoir ou première zone réactive.

La partie appelée réservoir n'a pour fonction que la mise en contact de l'échantillon avec une quantité suffisante de réactif de révélation, pour une largeur donnée de la seconde zone réactive. Il suffit donc en général de conserver la proportionnalité de la largeur des

5 trois premières zones pour conserver les caractéristiques de l'analyse.

La longueur du réservoir est réduite au minimum nécessaire au dépôt du réactif de révélation qui doit être d'un volume minimal donc aussi concentré que possible.

Dans une version préférée de l'invention, le filtre ou la mèche fait également office de réservoir, le réactif de révélation étant déposé en aval, selon le sens de la diffusion, de la
10 partie mise en contact avec l'échantillon. On s'assure ainsi que le réactif de révélation n'entre pas en contact avec le patient lors d'une analyse in vivo. Pour un supplément de sécurité, on peut aussi s'assurer préalablement que le réactif de révélation ne présente pas de toxicité in vivo.

Troisième partie: deuxième zone réactive ou support de la réaction.

15 Cette zone est celle de la lecture du ou des résultats, du contrôle de fonctionnement et du contrôle volumétrique.

Lors des travaux de mise au point de la présente invention, il a été constaté que lorsque le volume d'échantillon est en large excès par rapport au volume mort du dispositif d'analyse, la sensibilité des tests d'immunochromatographie latérale est indépendante de
20 la largeur de la deuxième zone réactive. Par contre, lorsque le volume d'échantillon n'est pas en excès, la sensibilité est directement dépendante du ratio entre la largeur de cette partie et le volume d'échantillon avec lequel l'analyse est menée. La conséquence en est que plus le volume d'échantillon est petit, plus la largeur de cette zone réactive doit être diminuée pour conserver une même sensibilité.

25 La troisième partie inclue le test et éventuellement le témoin de fonctionnement. Ces deux indicateurs font appel généralement à des réactions d'affinité, entre l'analyte recherché (A) et un ligand fixé (La) pour le test, et entre le réactif de révélation et un ligand fixé pour le contrôle de fonctionnement. La vitesse de ces réactions est généralement exprimée par une formule du type: $V_r = k \cdot I_{A/e} \times I_{La/e}$ où $I_{A/e}$ est la
30 concentration effective de l'analyte recherché, et $I_{La/e}$ est la concentration effective de son ligand fixé. Les concentrations effectives sont dépendantes de la vitesse de diffusion dans le support.

La membrane utilisé pour la troisième partie, supportant la réaction, devra avoir une vitesse de diffusion latérale juste suffisante pour la réalisation de l'analyse dans le temps
35 fixé, mais aussi lente que possible afin de permettre la réduction maximale de la longueur de cette partie, sans perte de sensibilité.

L'autre facteur à prendre en compte pour la réduction de la longueur de cette partie est la variation de la vitesse de migration du front de diffusion de l'échantillon en fonction de la distance parcourue par celui-ci. Plus cette distance augmente, plus la vitesse diminue,

plus la concentration effective augmente, plus la vitesse de réaction augmente, plus le produit de réaction est important pour un temps et une quantité d'analyte fixés, et donc plus la sensibilité est élevée. Il est donc nécessaire de garder une distance suffisante entre le début de cette partie et l'emplacement des ligands fixés. De plus, cette distance doit

5 permettre la formation aussi complète que possible des complexes analyte - réactif de révélation.

La troisième partie est en fait la partie la plus délicate à modifier, en raison d'une part du fait qu'elle contient les zones de lecture de résultat, et de contrôle de fonctionnement, d'autre part qu'elle doit également contenir le contrôle volumétrique de l'échantillon

10 analysé. La méthodologie permettant de définir ses caractéristiques, en particulier sa longueur et l'emplacement des différentes zones de résultat, fait donc l'objet d'un chapitre particulier que l'on trouvera ci-après.

En définitive, on s'aperçoit que la largeur des trois premières parties doit être diminuée de façon identique, ce qui présente la plus grande simplicité lors de la production

15 industrielle de ces tests en bandelettes.

Pour un volume d'échantillon inférieur à 20 μ l, la largeur de ces différentes parties devra être inférieure à 2 mm, une largeur comprise entre 1 et 2 mm étant suffisante pour une lecture facile des résultats.

Pour un volume d'échantillon inférieure à 100 μ l, la largeur de ces différentes parties

20 devra être inférieure à 5 millimètres.

METHODOLOGIE POUR LA TROISIEME PARTIE.

Il est préalablement nécessaire de déterminer la membrane servant de support pour cette

25 partie, ainsi que les ligands utilisés, pour le réactif de révélation comme pour les réactifs fixés, appelés aussi réactifs de capture, leur mode de fixation et l'ordre de leur emplacement par rapport au sens de diffusion de l'échantillon. Ces éléments sont indifféremment définis soit avec la méthodologie usuelle et les volumes d'échantillon correspondant, soit lors d'une première approche des faibles volumes d'échantillon. Il est

30 bien sûr préférable de donner la préférence aux conditions permettant d'obtenir la meilleure sensibilité à l'analyse, même en présence d'un volume d'échantillon en excès. Lorsque ces différents éléments sont déterminés, la méthodologie pour déterminer la distance exacte entre le début de cette partie et l'emplacement des ligands fixés est la suivante:

35 Des échantillons contenant la concentration limite d'analyte que l'on veut pouvoir détectée sont analysés avec des dispositifs dans lesquels on a fait varier cette distance, le volume d'échantillon étant en excès. La distance minimale permettant l'obtention d'un signal de détection de l'analyte est ainsi déterminée.

Il existe ensuite deux options concernant le volume d'échantillon et son calibrage ou contrôle:

1. adapter le test à un volume d'échantillon déterminé,
2. déterminer précisément le volume d'échantillon minimal nécessaire à l'obtention de résultats d'analyse satisfaisants, et ajuster de façon adéquate le témoin volumétrique.

Dans ces deux cas, il est nécessaire de placer le témoin ou contrôle volumétrique de l'échantillon après, ou en aval, par rapport au sens de la diffusion, de la zone d'analyse.

Selon la disposition du témoin volumétrique dans le test, on peut moduler le volume d'échantillon utilisé pour l'analyse.

1. Pour adapter le dispositif de test à un volume d'échantillon déterminé, on place le témoin volumétrique quelques millimètres en aval de la zone test.

La largeur des trois premières parties est alors réduite de façon à obtenir un signal positif dans la zone test avec le volume minimal d'échantillon pour lequel le dispositif d'analyse est destiné, cet échantillon contenant la concentration limite d'analyte que l'on veut pouvoir détectée. Cette largeur est inférieure à 5 millimètres pour des volumes d'échantillons inférieurs à 100 μ l et inférieure à 2 millimètres pour des volumes d'échantillons inférieurs à 20 μ l.

- Une fois cette largeur déterminée, on augmente alors la distance séparant la zone test du témoin volumétrique jusqu'à ce que celui-ci donne un signal avec le volume d'échantillon fixé, sans en donner avec un volume juste inférieur. Il est d'ailleurs à préciser qu'une précision supérieure à 90% peut être couramment être obtenue quand au volume d'échantillon ainsi contrôlé.

- La longueur de la partie analytique doit être inférieure à 70 millimètres pour des échantillons de volume inférieur à 100 μ l, sa largeur inférieure à 5 millimètres et sa surface inférieure à 450 mm².

- Nous avons déterminé que pour une membrane composé d'un ou plusieurs matériaux couramment utilisés (par exemple cellulose ou dérivés de cellulose, nylon, polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité), la partie analytique, définie comme la partie incluant la zone d'analyse et la zone de contrôle volumétrique, devait avoir une surface maximale de 4,5 mm² par μ l d'échantillon, soit 45 mm² pour 10 μ l, ou encore 450 mm² pour 100 μ l.

2. Pour déterminer le volume d'échantillon minimal au test, une fois les différentes longueurs et largeurs des trois premières parties réduites au minimum nécessaire, la longueur de la partie analytique réduite à moins de 70 millimètres, sa largeur à moins de 5 millimètres et sa surface à moins de 450 mm² pour des volumes d'échantillons inférieurs à 100 μ l, on procède à diverses analyses avec des volumes d'échantillons

variables, contenant la concentration limite d'analyte que l'on veut pouvoir détectée. Le volume minimal pour l'obtention du signal est alors déterminé.

Il ne reste plus qu'à procéder à divers essais avec ce volume minimal d'échantillon, en faisant varier l'emplacement du témoin volumétrique pour trouver la distance maximale où celui donne un signal.

Une fois le témoin volumétrique placé à cette distance, l'apparition de son signal indiquera que le volume minimal d'échantillon a bien diffusé dans le dispositif de test.

La dernière partie, appelée absorbant, est alors placée aussi près que possible de la bande du témoin de fonctionnement, ceci dans le but de diminuer la durée de l'analyse et permettre l'obtention des résultats aussi rapidement que possible.

Dans une première version, le témoin volumétrique est également le témoin de bon fonctionnement du test. Ce dernier est généralement constitué par la capture du réactif de révélation par un ligand fixé sur la membrane.

Dans une seconde version, préférable dans certains cas, le témoin volumétrique peut être en fait constitué par la capture d'un analyte présent dans l'échantillon, analyte dit de référence. Un réactif de révélation, identique ou différent de celui permettant la visualisation des résultats de l'analyse, permettra sa visualisation.

Ce contrôle ne dépendant pas directement du volume d'échantillon est utile dans le cas où l'on veut contrôler le volume d'échantillon par la détection d'un autre analyte que celui auquel l'analyse est destinée, analyte présent de manière constante dans les échantillons. Il peut également être utile s'il est nécessaire de référencer le résultat de l'analyse non par rapport à un volume d'échantillon, mais par rapport à une quantité déterminée d'un analyte de référence. On peut citer par exemple l'albumine sérique ou celle présente dans les larmes, divers types d'immunoglobulines ou tout autre analyte auquel sont généralement référencés les résultats concernant l'analyte recherché. Il peut également s'agir d'un précurseur, métabolite ou d'un composé compétitif pour le métabolisme de l'analyte recherché.

Cette seconde version a pour particularité que le témoin volumétrique calibre non le volume d'échantillon mais une quantité déterminée d'un analyte présent dans l'échantillon. Cette version peut être utile lorsque l'analyse a pour but non de déterminer simplement la présence ou le taux d'un analyte, mais un ratio anormal de la concentration d'un analyte par rapport à un analyte dit de référence. On peut citer par exemple, de façon non limitative ni exhaustive, l'albumine, diverses protéines présentes dans le sang ou d'autres tissus, les différentes classes d'immunoglobulines. Par exemple, il peut s'agir de comparer ou mesurer le ratio du taux d'anticorps spécifiques pour un antigène avec le taux d'anticorps spécifiques pour un autre antigène.

Dans les deux versions décrites précédemment, il faut retenir qu'une simple modification de l'emplacement du témoin volumétrique ou des dimensions des premières parties du dispositif permet de modifier le volume calibré ou la quantité d'analyte de référence.

Dans des versions dérivées de ces deux premières, on peut chercher à contrôler le volume et la quantité d'un analyte de référence ou de plusieurs, on peut aussi envisager de contrôler la quantité de plusieurs analytes de référence.

- Il est également possible d'utiliser un témoin volumétrique pour déterminer un débit de fluide ou d'échantillon in vivo, ainsi que sa viscosité par analyse temporelle.

Voici un mode d'application de l'invention auxquels cette dernière ne se limite en aucune façon.

Exemple 1:

- Cet exemple concerne un test rapide d'immunochromatographie latérale de détection des IgE totales dans les larmes humaines, selon la méthode sandwich.

La détection des IgE totales dans les larmes présentent certaines difficultés. Par exemple, le volume de larmes est presque toujours très faible, ainsi que leur débit, et leur recueil une opération difficile, peu appréciée des praticiens.

- Afin de recueillir l'échantillon d'une façon aussi simple que possible, d'effectuer une analyse avec un faible volume de larmes dans un temps raisonnable, tout en évitant de stimuler par des produits irritants le débit lacrymal, un dispositif de test a été mis au point selon l'invention présente.

- Le dispositif comprend un filtre - mèche servant également de réservoir pour le réactif de révélation, une membrane sur laquelle est située la zone de détection des IgE et un témoin de fonctionnement qui sert également au calibrage du volume d'échantillon, fonctionnant par capture du réactif de révélation. Le dispositif de test a une largeur de 1,75 millimètre et une longueur totale de 55 millimètres, avec une partie du filtre - mèche utilisée pour le recueil in vivo de l'échantillon d'une longueur de 7 mm. Le dispositif d'analyse a été ajusté de façon à fonctionner avec un volume d'échantillon de 10 µl. Sa partie analytique a donc une surface inférieure à 45 mm².

Le praticien n'a pas de recueil de larmes à effectuer, il lui suffit de mettre en place le test, au coin de l'oeil dans le cul de sac conjonctival. La taille et la composition du dispositif ont été ainsi optimisées pour un volume minimal de larmes. Pour la plupart des patients, le temps de contact du dispositif de test avec l'oeil est inférieur à 3 minutes.

- Le volume de larmes recueillies est calibré à l'aide du témoin de fonctionnement, qui fait donc aussi office de témoin volumétrique. Un signal apparaît lorsqu'un volume suffisant (10 µl) a été recueilli, ce qui permet une bonne reproductibilité du recueil et donc des résultats.

- Lorsque le témoin volumétrique donne un signal visible, 10 µl de larmes ont été recueillies par le dispositif. Celui est alors retiré de l'oeil et mis en contact avec une solution permettant à l'échantillon prélevé de diffuser dans la totalité du dispositif d'analyse. Pour cette application précise, il s'agit de 30 µl d'eau déminéralisée, mais

d'autres solutions sont utilisables, leur composition étant alors définie pour un fonctionnement optimal de l'analyse.

Ce dispositif a pu être ainsi validé sur différents échantillons, avec l'obtention d'une concordance satisfaisante entre l'interprétation des résultats (lecture) et les valeurs des

5 taux d'IgE déterminées par une méthode quantitative reconnue.

Le même dispositif de test permet également de détecter les IgE totales dans les écoulements du nez, dans le cas de suspicion de rhinites allergiques.

On peut également envisager de modifier ce dispositif de test pour la détection des IgE totales dans la salive ou tout autre liquide corporel.

10 **CHAMP D'APPLICATION**

Le dispositif de test de la présente invention est applicable à toute analyse utilisant une réaction affine ou non, comprenant un contrôle de fonctionnement interne, et caractérisé par la présence d'un réactif fixé sur un support, qui peut être de façon non limitative une

15 membrane, et l'utilisation d'un réactif de révélation. Le réactif de révélation peut comprendre des composants particuliers donnant une coloration ou des molécules réactives, par exemple et de façon non limitative, des enzymes, dont la réaction permet d'obtenir une coloration, ou une absence de coloration, indicatrice de la nature du résultat.

Ce dispositif est utilisable pour toute détection d'un élément susceptible d'intervenir dans

20 une réaction d'affinité avec un contre - élément.

On entend par « élément », dans le cadre de cet exposé, toute substance, composition, particule capable d'intervenir dans un système ligand - affinant, notamment dans une réaction affine avec un « contre - élément ». La généralité donnée au mot « élément » s'étend donc également à l'expression « contre - élément ». De façon non limitative,

25 « élément » et « contre - élément » peuvent être constitués par un antigène et un anticorps mutuellement complémentaires, affins, ou vice - versa.

L'élément recherché par ce dispositif de test peut-être de nature biologique, un anticorps ou un antigène, de nature chimique ou biochimique.

Ce dispositif de test et cette méthode est applicable à la détection de tout marqueur

30 biologique d'une ou de plusieurs pathologies infectieuses, par exemple et de façon non exhaustive les tests de sérologie, et les tests de détection d'antigène.

Ce dispositif de test et cette méthode sont également applicables lorsque l'élément recherché est un seul type d'anticorps ou plusieurs types, classes ou sous-classes. Un

35 exemple précis auquel les revendications du présent brevet ne se limite en aucune façon est la sérologie HIV ou Chlamydia, et pour lequel ce dispositif et cette méthode permettent de déterminer ou d'évaluer le taux d'anticorps dirigés contre un antigène précis, dans le sérum ou des échantillons d'autre nature, en le calibrant par rapport au taux d'anticorps dirigés contre un autre antigène.

Ce dispositif de test et cette méthode sont également applicables lorsque l'élément recherché est un ou plusieurs antigènes spécifiques d'une ou de plusieurs pathologies.

Ce dispositif de test et cette méthode sont aussi applicables dans le cadre de suivi thérapeutique.

- 5 Ce dispositif de test et cette méthode sont également applicables pour tout type d'échantillon, qu'il s'agisse de tissus humains, animaux et végétaux, qu'ils soient solides ou liquides. Il est applicable avec tout type d'échantillon, par exemple et de façon non limitative: sécrétions corporelles, mucus, sueur, larmes, fluides lacrymaux et nasaux, salive, humeur, pus.
- 10 Par exemple et de façon non limitative, ce dispositif de test peut permettre la caractérisation de micro-organismes dans les liquides d'abcès, panaris, et suintements de plaies.
- Ce dispositif de test est également applicable à toute analyse in vitro sur des échantillons de faible volume, par exemple prélevés chez des enfants et des nourrissons.
- 15 Il peut également permettre de faire des analyses sur des échantillons de viande, que ce soit dans un but de recherche de micro-organismes, ou de marqueur de putréfaction ou tout autre marqueur biologique, biochimique ou chimique.
- Le dispositif de test permet donc la détection de tout analyte, par exemple pour le diagnostic en santé humaine, dans des échantillons de faible volume qui peuvent
- 20 également être difficilement à prélever.
- L'invention présente est applicable à la recherche en biologie et dans le domaine du diagnostic médical, ainsi que dans tous les domaines des sciences de diagnostic et d'analyse, tels les sciences vétérinaires, agricoles, agro-alimentaires, alimentaires et d'expertises, où il est nécessaire de détecter un élément, composé ou substance, ou de
- 25 déterminer son taux. Elle est également applicable dans l'industrie, et à tout processus de détection qualitative utilisé industriellement.
- Ce dispositif de test peut être utiliser soit avec une lecture visuelle, effectuée par un opérateur humain, soit avec un appareil de lecture couplé ou non à un appareil de traitement de données.

REVENDICATIONS

1) Dispositif de test pour l'analyse par une technique immunochromatographique dans laquelle la visualisation des résultats est associée à une coloration, caractérisé par le fait qu'il inclut au moins un témoin volumétrique donnant un signal dont la couleur ou l'intensité est fonction du volume d'échantillon qui a diffusé dans le dispositif de test, permettant de déterminer le volume d'échantillon analysé, ou de vérifier que le volume d'échantillon nécessaire à l'analyse a effectivement diffusé dans ledit dispositif.

2) Dispositif de test selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il contient au moins un témoin volumétrique et de bon fonctionnement du test.

3) Dispositif de test selon l'une des revendications 1 ou 2, pour l'analyse d'échantillons de volume inférieur à 100 μl , caractérisé par le fait que sa partie analytique a une surface inférieure ou égale à 4,5 mm^2 par μl d'échantillon, par exemple inférieure à 45 mm^2 pour 10 μl , ou encore 450 mm^2 pour 100 μl , sa longueur étant égale ou inférieure à 70 millimètres et sa largeur inférieure à 5 millimètres.

4) Dispositif de test selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il inclut une mèche non toxique destinée au prélèvement in vivo et permettant la mise en contact d'un tissu organique avec un dispositif de test immunochromatographique, dont la largeur ou le diamètre est inférieur à 5 millimètres.

5) Dispositif d'analyse selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait qu'il inclut un élément permettant la mise en contact direct de l'échantillon avec sa partie analytique, et sur lequel est déposée un réactif de révélation en aval de la zone de contact.

6) Dispositif de test selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé par le fait qu'il inclut au moins une enzyme et un substrat dont la réaction entraîne l'apparition d'une coloration, permettant la visualisation du résultat.

7) Dispositif de test selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé par le fait que le ou les signaux sont obtenus à l'aide d'un ou plusieurs réactifs colorés comprenant une substance particulière colorée qui peut être un complexe d'or colloïdal ou de sels de métaux ou des billes de latex.

8) Procédé de production d'un dispositif de test selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé par le fait que l'emplacement et la composition d'au moins un témoin volumétrique inclus dans le dispositif sont fixés de façon à ce que l'intensité ou la couleur de son signal soit dépendante du volume d'échantillon analysé.

9) Procédé de production d'un dispositif de test selon la revendication 8, caractérisé par le fait que l'emplacement et la composition d'au moins un témoin volumétrique sont ajustés pour obtenir une correspondance entre l'intensité ou la couleur de son signal et des valeurs connues ou plages de valeurs connues de taux d'une ou de plusieurs substances de référence, cette correspondance entre le signal et une ou des

valeurs d'un ou plusieurs éléments référentiels étant utilisée pour l'analyse et l'interprétation des résultats.

- 10) Ensemble ou trousse d'analyse caractérisé par le fait qu'il contient un dispositif de test selon l'une quelconque des revendications précédentes, dont les résultats sont lus
5 par un appareil.