

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①① N° de publication :

3 019 654

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

14 53038

⑤① Int Cl⁸ : **G 01 N 33/543** (2014.01), B 01 L 3/00, C 12 Q 1/00,
G 01 N 35/00

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ **CONTROLES POUR LA MISE EN OEUVRE DE PROCEDES D'ANALYSE MULTIPLEXE.**

②② **Date de dépôt** : 04.04.14.

③⑦ **Priorité** :

④③ **Date de mise à la disposition du public
de la demande** : 09.10.15 Bulletin 15/41.

④⑤ **Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention** : 30.10.20 Bulletin 20/44.

⑤⑥ **Liste des documents cités dans le rapport de
recherche** :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥⑦ **Références à d'autres documents nationaux
apparentés** :

Demande(s) d'extension : Polynésie-Fr

⑦① **Demandeur(s)** : *BIO-RAD INNOVATIONS Société
par actions simplifiée* — FR.

⑦② **Inventeur(s)** : VEDRINE CHRISTOPHE, RENE,
ROGER et LAMBERT NADINE, MARIE, RENEE.

⑦③ **Titulaire(s)** : BIO-RAD INNOVATIONS Société par
actions simplifiée.

⑦④ **Mandataire(s)** : CABINET LAVOIX Société par
actions simplifiée.

FR 3 019 654 - B1



Contrôles pour la mise en œuvre de procédés d'analyse multiplexe

Domaine technique

5 La présente invention concerne des contrôles pouvant être utilisés pour sécuriser les résultats de procédés d'analyse multiplexe comprenant une ou plusieurs étapes.

Etat de la technique

10 Un procédé d'analyse multiplexe permet de détecter, de manière simultanée, la présence éventuelle de plusieurs analytes au sein d'un même échantillon. L'analyse multiplexe présente plusieurs avantages, tels qu'un gain de temps en permettant d'analyser plusieurs analytes en même temps, une moindre consommation de réactifs et de consommables, et également une moindre quantité d'échantillon nécessaire pour la détection des analytes.

15 Il est courant d'utiliser un ou plusieurs contrôles pour valider les résultats obtenus à l'issue d'un procédé d'analyse visant à détecter la présence d'un ou plusieurs analytes. La fiabilité des résultats fournis par un procédé d'analyse est en effet un enjeu majeur, notamment lorsqu'il s'agit d'analyses destinées au diagnostic médical et/ou la qualification du don transfusionnel.

20 Un contrôle positif classiquement utilisé consiste à vérifier la détection d'un composé connu, utilisé dans une quantité connue et qui correspond à un analyte dont la présence éventuelle est recherchée dans un échantillon donné. Toutefois, ce type de contrôle permet de valider uniquement la mise en œuvre globale du procédé d'analyse et ne permet pas de valider chaque étape du procédé.

25 Par ailleurs, d'autres types de contrôle peuvent être utilisés. Par exemple, le document WO2004/046685 utilise des contrôles pour vérifier la qualité des réactifs utilisés dans des tests d'immuno-histochimie. A cet effet, une lame contrôle comprenant une série de dilutions de différents composés contrôle est utilisée. Une coloration positive de la lame contrôle au niveau d'un composé contrôle ne doit être observée que si un anticorps spécifique dudit composé contrôle ou un rapporteur ou substrat dudit composé contrôle est utilisé au cours du procédé d'immuno-marquage. Ce procédé de vérification de la qualité des réactifs nécessite l'utilisation d'un nombre important de composés contrôles sur la lame contrôle.

30 En fait, il n'existe pas actuellement de moyen simple permettant de contrôler l'ensemble des étapes dans le cas d'un procédé d'analyse multiplexe : en particulier, le dépôt des échantillons, le dépôt des réactifs, les différents cycles de lavage et

d'incubations. Il est pourtant crucial dans le domaine de la transfusion sanguine et du diagnostic médical d'atteindre un haut niveau de sécurisation et de traçabilité.

Ainsi, il existe un réel besoin de fournir des solutions permettant de garantir la fiabilité des résultats obtenus lors de la mise en œuvre de procédés d'analyse multiplexe et qui permettent notamment de valider chaque étape du procédé.

Description détaillée

La présente invention repose sur la mise en évidence par les inventeurs de moyens de contrôle permettant de garantir la fiabilité des résultats obtenus, en vérifiant que chaque étape d'un procédé d'analyse multiplexe s'est déroulée correctement (et non en vérifiant seulement une mise en œuvre globale du procédé). Ainsi, pour la première fois, les inventeurs fournissent des contrôles qui permettent de valider le dépôt de l'échantillon lui-même et plus généralement les différentes étapes du procédé.

En combinant seulement deux ou trois contrôles selon l'invention, il est ainsi possible de valider l'étape de dépôt de l'échantillon, la ou les étape(s) de dépôt des ligands de détection spécifiques des analytes à détecter dans l'échantillon, les différentes étapes de lavage et d'incubation et, le cas échéant, l'étape de dépôt d'un rapporteur d'un marqueur de détection et/ou l'étape de dépôt d'un substrat du marqueur couplé audit rapporteur.

Dans le procédé d'analyse multiplexe selon l'invention, seulement deux ou trois contrôles sont nécessaires à la validation de chaque étape de l'ensemble du procédé multiplexe.

Outre la validation des résultats, l'utilisation des contrôles selon l'invention permet également d'identifier des failles potentielles existantes lors de la mise en œuvre du procédé d'analyse multiplexe, et de modifier par exemple la ou les étapes correspondantes pour améliorer la mise en œuvre du procédé d'analyse.

La présente invention présente également l'avantage d'être simple de mise en œuvre, en ne nécessitant qu'un nombre limité de contrôles, en n'ajoutant pas d'étapes supplémentaires au procédé d'analyse et en ne nécessitant pas l'utilisation d'un appareillage supplémentaire (par exemple, ne nécessitant pas l'utilisation d'un spectrophotomètre). En effet, les étapes du procédé d'analyse sont réalisées dans un seul emplacement (par exemple, le tube ou le puits dans lequel est placé l'échantillon) et les contrôles, par exemple sous forme de spots ou de billes, sont traités en même temps que les spots ou billes servant à la détection des analytes.

Le premier type de contrôle selon l'invention est le contrôle du dépôt d'un échantillon qui permet de vérifier le dépôt de l'échantillon. Dans certains modes de

réalisation détaillés ci-après, le contrôle du dépôt de l'échantillon permet également de vérifier le dépôt d'un ou plusieurs ligands de détection d'analyte.

5 Par « dépôt de l'échantillon ou d'un additif » ou « ajout de l'échantillon ou d'un additif », on entend la mise en présence de l'échantillon ou d'au moins un additif avec des composés d'intérêt fixés sur un support solide.

Par « au moins un », on entend dans la présente demande un ou plusieurs, « plusieurs » signifiant en particulier deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf, dix, onze, douze, treize, quatorze, quinze, seize ou plus de seize.

10 Par « dépôt d'un ligand de détection, d'un rapporteur ou d'un substrat » ou « ajout d'un ligand de détection, d'un rapporteur ou d'un substrat », on entend la mise en présence d'un ligand de détection, d'un rapporteur ou d'un substrat avec des composés d'intérêt fixés sur un support solide et les éventuels composés fixés sur lesdits composés d'intérêt.

15 Le deuxième type de contrôle est le contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte qui permet de vérifier le dépôt d'un ou de ligands de détection (par exemple un mélange de ligands de détection) spécifiques d'analytes à détecter dans l'échantillon. Ce contrôle permet également de valider les étapes d'incubation et de lavage.

20 Le troisième type de contrôle est le contrôle du dépôt d'un rapporteur qui permet de vérifier que la ou les étape(s) de révélation se sont déroulées correctement. Le contrôle du dépôt d'un rapporteur est utile en cas de marquage indirect des ligands de détection.

25 Enfin, les contrôles selon l'invention sont particulièrement appropriés pour la mise en œuvre de procédés d'analyse multiplexe en micro-réseau, par exemple sur un support solide de type microplaque, ou en puce liquide, par exemple sur un support solide de type billes.

Echantillon

L'échantillon à analyser est de préférence un échantillon biologique.

30 L'échantillon biologique peut être un fluide biologique, tel qu'un échantillon de sang, dérivé de sang (tel que plasma ou sérum), urine, fluide céphalorachidien, salive, ou un échantillon de tissu, tel qu'un tissu obtenu par biopsie, une cellule ou un ensemble de cellules, un extrait végétal, ou leurs combinaisons.

Un dérivé de sang désigne tout produit, en particulier fluide, obtenu à partir d'un échantillon de sang.

35 L'échantillon à analyser peut également être un milieu de culture et/ou un surnageant de culture.

Avant d'être analysé, l'échantillon peut subir une ou plusieurs étapes préalables de traitement, tels que dilution, centrifugation, traitement thermique, lyse cellulaire (par exemple par un ou plusieurs agents chaotropiques, un ou plusieurs agents réducteurs et/ou par chauffage), extraction, réaction de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), ajout d'un ligand de détection non marqué ou leurs combinaisons. L'ajout d'un ligand de détection non marqué est en particulier utile pour la mise en œuvre d'un test de neutralisation, qui est en soi un test connu de l'homme du métier.

L'échantillon peut également être un mélange d'au moins deux échantillons qui peuvent être de même nature ou de nature différente.

A titre d'exemple de mélange d'échantillons de nature différente, on peut citer un mélange de sang et de sérum, un mélange de sang et de plasma, un mélange de sérum et de plasma, ou encore un mélange de sang, sérum et plasma.

Un échantillon préféré selon l'invention est un échantillon ou un mélange d'échantillons de sang et/ou dérivé du sang.

Analyte

Un analyte à détecter dans l'échantillon peut être tout type de composé, naturel ou synthétique, que l'on souhaite détecter et / ou quantifier dans un échantillon.

Un analyte peut par exemple être une protéine, un peptide, une glycoprotéine, un glucide, un lipide, une cellule, une organelle, un virus ou un acide nucléique.

La cellule peut être une cellule animale, une cellule végétale, une cellule de bactérie, une cellule de métazoaire, une cellule de levure, une cellule de champignon, ou un protozoaire.

Un acide nucléique désigne un polymère de nucléotides reliés par des liaisons phosphodiester, tel qu'un acide désoxyribonucléique (ADN), un acide ribonucléique (ARN) ou un analogue de ceux-ci, tels que des phosphorothioates ou des thioesters, sous forme simple brin ou double brin.

Un analyte ou au moins un des analytes est par exemple choisi dans le groupe consistant en un antigène, un anticorps, un fragment d'anticorps, un haptène, une hormone, un récepteur d'hormone, une enzyme ou un acide nucléique.

Par « antigène », on désigne ici une molécule naturelle, recombinante ou synthétique reconnue par des anticorps ou des cellules du système immunitaire et capable d'engendrer une réponse immunitaire lorsqu'elle est présentée dans des conditions appropriées au système immunitaire d'un hôte. Ce peut être une molécule, en particulier un polypeptide, comprenant ou consistant en au moins un épitope qui peut être linéaire ou conformationnel. Le terme « épitope linéaire » désigne un polypeptide, en

particulier un peptide, comprenant ou consistant généralement en 3 à 15, plus généralement 5 à 15 acides aminés, et de préférence au moins 6, 8, 10 ou 12 acides aminés, capable de se lier à une molécule d'anticorps dirigé contre ledit antigène. Le terme « épitope conformationnel » désigne une structure tridimensionnelle reconnue par un anticorps et déterminée par la juxtaposition de plusieurs acides aminés dans l'espace, qui peuvent être non contigus dans la séquence peptidique de la protéine (ou du polypeptide) contre laquelle est dirigé cet anticorps, mais qui, du fait du repliement de la chaîne polypeptidique, se retrouvent proches les uns des autres dans l'espace, et peuvent ainsi former un motif susceptible d'être reconnu par un anticorps.

Un antigène est par exemple une protéine (en particulier une protéine native ou recombinante), un peptide (par exemple un peptide synthétique), une glycoprotéine, un glucide ou un lipide, ledit peptide pouvant être associé ou non à une molécule support, par exemple la BSA (albumine de sérum bovin).

Par « molécule support » (appelé également « molécule porteuse »), on entend notamment dans la présente demande une molécule support protéique ou glucidique. Une molécule support peut être un polypeptide (en particulier une protéine ou un peptide) naturel ou non naturel (par exemple une protéine recombinante ou un peptide synthétique), un polymère fonctionnalisé (de type dextran, polysaccharide ou poly-lysine) ou un co-polymère mixte (en particulier un co-polymère d'acides aminés différents, par exemple un co-polymère lysine-tyrosine). Une molécule support peut être un anticorps (en particulier un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal), par exemple une immunoglobuline.

Un exemple de molécule support est la BSA.

Dans un mode de réalisation particulier, la molécule support n'est pas un anticorps.

Par « haptène », on désigne ici une molécule de faible poids moléculaire capable d'être reconnue par le système immunitaire, mais qui est immunogène uniquement lorsqu'elle est couplée à une molécule support.

Un analyte ou au moins un des analytes est, de préférence, un composé permettant de diagnostiquer une condition d'un sujet, pathologique ou non, ou de diagnostiquer les risques de développer une condition, pathologique ou non. Un exemple de condition non pathologique est une grossesse.

Le sujet peut être un homme, un animal non humain ou un végétal. L'animal non humain est de préférence un mammifère, tel qu'un chat, chien, singe, lapin, souris, rat.

Le terme « homme » est utilisé de manière large et désigne notamment un homme ou une femme de tout âge, tel qu'un nourrisson, un enfant, un adolescent, un adulte ou une personne âgée.

Lorsque l'analyte ou au moins un des analytes est un antigène, il s'agit de préférence d'un antigène permettant de diagnostiquer une infection, par exemple une infection causée par un virus, une bactérie, un champignon ou un parasite.

Lorsque l'analyte ou au moins un des analytes est un anticorps, il s'agit de préférence d'un anticorps permettant de diagnostiquer une infection, par exemple une infection causée par un virus, une bactérie, un champignon ou un parasite.

Typiquement, il peut s'agir d'un ou plusieurs antigène(s) et/ou d'un ou plusieurs anticorps spécifique(s) de :

- un virus, tel que VIH (*Virus de l'Immunodéficience Humaine*), en particulier VIH-1 ou VIH-2, VHB (*Virus de l'Hépatite B*), VHC (*Virus de l'Hépatite C*), VPH (*papillomavirus humain*), HTLV (*Virus T-lymphotropique humain*), en particulier HTLV-I ou HTLV-II,
- un parasite, tel qu'un parasite susceptible de provoquer la Toxoplasmose (en particulier *Toxoplasma gondii*), la Malaria (en particulier un parasite du genre *Plasmodium*, par exemple *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* ou *Plasmodium knowlesi*) ou la maladie de Chagas (en particulier *Trypanosoma cruzi*), chez un homme ou un animal non humain, ou
- une bactérie, telle qu'une bactérie susceptible de provoquer la Syphilis (en particulier *Treponema pallidum*) ou la maladie de Lyme (en particulier une bactérie du genre *Borrelia*), chez un homme ou un animal non humain.

Par « parasite », on désigne ici un métazoaire ou un protozoaire parasitant un organisme et entraînant une parasitose. Un parasite au sens de l'invention n'est donc ni un virus, ni une bactérie, ni un champignon.

L'analyte ou au moins un des analytes peut également être un marqueur d'une maladie, tel qu'un marqueur d'une maladie cardiovasculaire ou un marqueur du diabète, un marqueur de l'évolution d'une maladie, telle qu'une hépatite, un marqueur de l'évolution d'une infection causée par un virus, une bactérie, un champignon ou un parasite, un marqueur de résistance à un traitement, par exemple à un traitement antiviral, un traitement antibiotique ou un traitement contre un cancer.

Plusieurs (par exemple deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf, dix, onze, douze, treize, quatorze, quinze ou plus de quinze) analytes tels que décrits dans la présente demande peuvent être détectés simultanément dans un échantillon au cours

d'un procédé d'analyse multiplexe. Cela peut permettre de diagnostiquer, dans un même échantillon, une ou plusieurs infection(s) ou maladie(s), l'évolution d'une infection ou maladie, une condition (pathologique ou non), un risque de développer une condition (pathologique ou non) ou encore un marqueur de résistance à un traitement chez un

5

Les analytes détectés au cours d'un procédé d'analyse multiplexe peuvent être de même nature (par exemple uniquement des anticorps ou uniquement des antigènes) ou de nature différente (par exemple, au moins un antigène et au moins un anticorps).

10

Composé contrôle

Par « composé contrôle », on désigne ici un composé présent naturellement dans l'échantillon à analyser, de préférence en une concentration détectable dans tous les échantillons de même nature.

15

Par « échantillon de même nature », on entend un échantillon de même origine prélevé sensiblement de la même manière chez différents sujets ou chez un même sujet à différents intervalles de temps et, le cas échéant, ayant subi le ou les mêmes étapes de traitement.

20

Une « concentration détectable » est une concentration permettant de détecter la présence d'un composé contrôle lors d'un test, notamment un test immunologique de type sandwich dans lequel un composé contrôle se lie à un anticorps de capture fixé sur un support solide et est détecté par un anticorps de détection marqué.

De préférence, la concentration d'un composé contrôle varie peu dans des échantillons de même nature.

25

Par l'expression « la concentration d'un composé contrôle varie peu dans des échantillons de même nature », on entend ici une concentration qui varie de moins de 60%, de préférence de moins de 40%, plus préférentiellement de moins de 20 % d'un échantillon à l'autre, la concentration étant donnée en $\mu\text{g/mL}$.

30

Dans un mode de réalisation avantageux, un composé contrôle est présent dans l'échantillon dans une concentration du même ordre de grandeur que la concentration du ou des analytes à détecter, lorsque ces analytes sont présents. De préférence, un composé contrôle est présent dans l'échantillon dans une concentration du même ordre de grandeur que la concentration de chacun des analytes à détecter.

La concentration d'un composé contrôle est du même ordre de grandeur que la concentration d'un analyte à doser.

De préférence, la concentration du composé contrôle est au plus 5 décades inférieure ou supérieure à celle dudit analyte à doser, lorsqu'il est présent dans l'échantillon, de préférence au plus 4 décades, plus préférentiellement au plus 3 décades.

5 Par exemple, la concentration d'un composé contrôle est au plus de 100 µg/mL, de préférence au plus 10 µg/mL, plus préférentiellement au plus 1 µg/mL, pour une concentration d'un analyte à doser qui serait de 1 ng/mL.

10 De préférence, la concentration du composé contrôle est du même ordre de grandeur que la concentration d'un analyte, lorsque l'écart entre la concentration de l'analyte dans un échantillon à analyser qui contient cet analyte, et celle du composé contrôle est au plus de 5 décades, de préférence au plus de 4 décades, plus préférentiellement au plus de 3 décades.

15 Dans le cas d'un échantillon d'origine humaine ou animale, un composé contrôle a de préférence une structure conservée au sein de la population humaine ou animale considérée pour l'analyse. Dans un mode de réalisation préféré, un composé contrôle ne présente pas de polymorphisme au sein de la population considérée.

Le composé contrôle n'est, de préférence, pas un marqueur d'une maladie.

Lorsqu'au moins un analyte est détecté par un anticorps, un composé contrôle est, de préférence, un composé détectable par un anticorps.

20 Le composé contrôle n'est, de préférence, pas dénaturé par la ou les éventuelles étapes préalables de traitement de l'échantillon, de manière à être détectable par un anticorps.

Le composé contrôle peut être une molécule, ou un complexe d'au moins deux molécules, identiques ou différentes.

25 A titre d'exemple, lorsque l'échantillon à analyser est un échantillon de sang ou de plasma, en particulier de sang humain ou plasma humain, un composé contrôle peut être le récepteur soluble de la transferrine complexé à la transferrine, une hormone, par exemple un stéroïde, un facteur de coagulation, par exemple un facteur de coagulation choisi parmi le facteur VIII, IX, X, XI, XII ou XIII.

30 Dans un mode de réalisation particulier, un composé contrôle n'est pas le facteur XIII.

35 Dans un mode de réalisation particulier, un composé contrôle n'est pas une immunoglobuline de type G (IgG), en particulier une IgG humaine, et/ou n'est pas une immunoglobuline de type M (IgM), en particulier une IgM humaine, ou plus généralement, n'est pas une immunoglobuline, en particulier une immunoglobuline humaine.

Le récepteur soluble de la transferrine complexé à la transferrine est un complexe comprenant deux molécules du récepteur soluble de la transferrine et deux molécules de transferrine.

5 Par exemple, le récepteur soluble de la transferrine complexé à la transferrine est généralement présent dans une concentration comprise de 0,8 µg/mL à 4 µg/mL dans les échantillons à analyser provenant d'un sujet humain, indépendamment de la condition du sujet.

10 Lorsque la concentration d'un composé contrôle peut varier, par exemple en fonction de la nature de l'échantillon et/ou de la condition du sujet dont est issu l'échantillon, il peut être avantageux d'utiliser au moins deux composés contrôles différents.

Additif

15 Un additif est un composé ou un ensemble de composés qui n'est (ne sont) pas présents dans l'échantillon.

Un additif peut être en particulier un antigène ou un haptène, ledit antigène ou ledit haptène pouvant être couplé ou non à une molécule support.

20 A titre d'exemple, pour un échantillon biologique humain ou animal, un composé ou un des composés qui n'est pas présent dans l'échantillon à analyser est par exemple sélectionné dans le groupe consistant en la digoxigénine, une hormone végétale, un alcaloïde, un stéroïde végétal, un acide nucléique et un pesticide.

La digoxigénine est un stéroïde extrait de certaines plantes.

25 Un pesticide est par exemple un insecticide, tel qu'un organophosphoré ou un organochloré, un herbicide, tel qu'une triazine ou de la phényl-urée, ou leurs combinaisons.

Un additif préféré selon l'invention est de la digoxigénine couplée à une molécule support, une auxine couplée à une molécule support, une triazine couplée à une molécule support, ladite molécule support étant par exemple la BSA.

Un additif préféré selon l'invention est de la digoxigénine couplée à de la BSA.

30 De plus, l'additif n'interfère pas avec la détection des analytes lors de la mise en œuvre d'un procédé d'analyse multiplexe. En particulier, l'additif n'interfère pas avec les analytes à détecter, le ou les ligands de capture utilisés, le ou les ligands de détection utilisés, le ou les composés contrôle, le cas échéant le ou les rapporteurs, le cas échéant le ou les substrats, et la détection du signal.

35 Dans un mode de réalisation particulier, l'additif ne comprend ou ne consiste pas en la biotine ou un analogue de la biotine et/ou en l'avidine ou un analogue de l'avidine

(en particulier la streptavidine ou la neutravidine), ladite biotine, avidine ou un de leurs analogues étant greffé ou non sur une molécule support.

Ligand de capture

5 Un ligand de capture est un anticorps ou un antigène qui est fixé sur le support solide, en particulier au niveau d'un spot ou à la surface d'une bille.

Un ligand de capture peut être spécifique d'un analyte à détecter dans l'échantillon, d'un composé contrôle ou d'un additif.

10 Un ligand de capture peut être un anticorps, un antigène, un peptide, un glucide, un lipide ou un acide nucléique.

Un ligand de capture est, de préférence, un anticorps ou un antigène.

Lorsqu'un ligand de capture est un anticorps, il s'agit par exemple d'un anticorps monoclonal ou d'un anticorps polyclonal.

15 Ligand de détection

Un ligand de détection est destiné à révéler la présence d'un composé dont il est spécifique.

Un ligand de détection peut être un anticorps, un antigène, un peptide, un glucide, un lipide ou un acide nucléique.

20 Un ligand de détection est, de préférence, un anticorps ou un antigène.

Lorsqu'un ligand de détection est un anticorps, il s'agit par exemple d'un anticorps monoclonal ou d'un anticorps polyclonal.

25 Un ligand de détection est, de préférence, un ligand de détection marqué, c'est-à-dire un ligand auquel est attaché un marqueur de détection (qui peut être par exemple la biotine ou une peroxydase), de manière covalente ou non.

Lorsqu'un ligand de détection n'est pas marqué, sa détection peut être obtenue en utilisant un anticorps marqué spécifique dudit ligand de détection.

Un ligand de détection peut être spécifique d'un analyte à détecter dans l'échantillon, d'un composé contrôle ou d'un additif.

30 Un ligand de détection peut être identique au ligand de capture ou à un des ligands de capture utilisés, à l'exception de la présence éventuelle d'un marqueur de détection, et/ou se lier au composé dont il est spécifique au niveau de la même zone que celle liée par le ligand de capture ou un des ligands de capture. Dans ce cas, si ledit ligand de capture et ledit ligand de détection sont des anticorps, il s'agit alors d'un
35 « sandwich homologue ».

Un ligand de capture et le ligand de détection ou un des ligands de détection peuvent être spécifiques de zones distinctes au niveau du composé dont ils sont spécifiques, de manière à éviter une compétition du ligand de capture et du ligand de détection vis-à-vis du composé dont ils sont spécifiques, en raison d'un encombrement stérique. Dans ce cas, si ledit ligand de détection et ledit ligand de capture sont des anticorps, il s'agit alors d'un « sandwich hétérologue ».

Dans un mode de réalisation préféré, un ligand de détection et un ligand de capture spécifiques du même composé ne se lient pas au même endroit sur ledit composé. Plus préférentiellement, ledit ligand de détection se lie à une zone dudit composé qui est éloignée de la zone de liaison avec ledit ligand de capture.

Dans un autre mode de réalisation préféré, un ligand de détection est identique à un ligand de capture, à l'exception de la présence éventuelle d'un marqueur de détection, et/ou se lie au composé dont il est spécifique au niveau de la même zone que celle liée par ledit ligand de capture, lorsque le composé dont il est spécifique est sous forme d'un complexe présentant au moins deux zones de liaison identiques.

Marqueur de détection

Un marqueur de détection peut être un marqueur direct ou un marqueur indirect.

Un marqueur direct est un marqueur dont le signal peut être détecté directement, c'est-à-dire sans nécessiter l'ajout préalable d'un rapporteur.

Un marqueur direct est par exemple sélectionné dans le groupe consistant en un radio-isotope, un fluorochrome et un élément lourd de la classification périodique, tel qu'un lanthanide, un composé luminescent, un métal de transition tel que le ruthénium, un chromogène et des nanoparticules colorées, fluorescentes ou luminescentes.

Un « composé luminescent » désigne en particulier dans la présente demande un composé électroluminescent, thermoluminescent ou (de préférence) chimiluminescent.

Un exemple de composé luminescent (plus précisément de composé thermoluminescent) que l'on peut utiliser comme marqueur direct consiste en des nanoparticules de silice comprenant (par exemple additionnée de ou dopée par (de l'anglais « doped »)) des molécules d'un composé dioxétane, en particulier le composé 1,2-dioxétane, ou d'un dérivé d'un composé dioxétane, par exemple un dérivé du 1,2-dioxétane.

Un marqueur indirect est un marqueur dont la détection du signal nécessite préalablement l'ajout d'un rapporteur, et le cas échéant l'ajout d'un substrat du marqueur couplé audit rapporteur.

Un rapporteur est un substrat du marqueur indirect ou une molécule se liant spécifiquement au marqueur indirect, ladite molécule étant elle-même un marqueur direct ou indirect ou étant elle-même couplée à un marqueur direct ou indirect.

5 Un marqueur indirect peut être par exemple une enzyme (en particulier une enzyme produisant un composé luminescent à partir d'un substrat), la biotine, l'avidine, la streptavidine, la neutravidine, un haptène, un antigène ou un anticorps.

Un rapporteur d'une enzyme est par exemple le substrat de la dite enzyme.

Un rapporteur d'un composé luminescent est par exemple une enzyme ou un catalyseur.

10 Un rapporteur de la biotine est par exemple l'avidine, la streptavidine ou la neutravidine, de préférence couplée à un marqueur direct ou à un marqueur indirect, tel qu'une enzyme ou un catalyseur.

Un exemple d'enzyme est la peroxydase, par exemple la peroxydase de raifort (HRP).

15 Un rapporteur de la biotine préféré selon l'invention est la streptavidine couplée à une peroxydase, de préférence la peroxydase de raifort.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le marqueur de détection ou un des marqueurs de détection utilisé est ou a pour substrat le luminol (3-aminophthalhydrazide, appelé également 5-amino-2,3-dihydro-phthalazine-1,4-dione, de formule brute $C_8H_7N_3O_2$), l'isoluminol (appelé également 4-aminophthalhydrazide), un composé acridine, coelenterazine, dioxetane ou peroxyoxalic, ou un de leurs dérivés, et en particulier un composé décrit dans la publication *Dodeigne C. et al (2000), Talanta 51, 415-439, « Chemiluminescence as diagnostic tool. A review »*.

25 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le marqueur de détection ou un des marqueurs de détection utilisés a pour substrat le luminol, l'isoluminol ou un de leurs dérivés.

Un dérivé du luminol ou de l'isoluminol est, de préférence, une molécule obtenue à partir du luminol ou de l'isoluminol respectivement, par toute(s) modification(s) possible(s) (par exemple chimique et/ou enzymatique). Un dérivé du luminol ou de l'isoluminol est en particulier un substrat d'une enzyme peroxydase, la réaction de ladite enzyme peroxydase avec ledit dérivé du luminol ou isoluminol permettant la production d'un composé chimiluminescent.

30 Un dérivé de l'isoluminol peut être par exemple l'aminoethylisoluminol (ou AEI), l'aminoethylethylisoluminol (ou AEEI), l'aminobutylisoluminol (ou ABI), l'aminobutyléthylisoluminol (ou ABEI), l'aminopentyléthylisoluminol (ou APEI), l'aminohexylisoluminol (ou AHI), l'aminohexyléthylisoluminol (ou AHEI),

l'aminooctylmethylisoluminol (ou AOMI) ou l'aminooctylethylisoluminol (ou AOEI), tels que décrits dans la publication *Dodeigne C. et al (2000), Talanta 51, 415-439, « Chemiluminescence as diagnostic tool. A review ».*

5 Révélation

L'étape ou les étapes de révélation correspond(ent) à la détection du signal produit par le ou les marqueurs de détection.

Lorsque le signal détecté est un signal en fluorescence ou en luminescence, le « signal produit » est en particulier un « signal émis ».

10 L'étape ou les étapes de révélation dépend(ent) du type de marqueur utilisé.

Le signal produit ou émis par un marqueur direct de type fluorochrome peut être lu directement en fluorescence.

Un marqueur indirect de type enzyme, de type composé luminescent ou de type biotine nécessite l'ajout d'un rapporteur.

15 Comme indiqué ci-dessus, un marqueur indirect de type biotine nécessite l'ajout d'un rapporteur, de préférence d'un rapporteur couplé à un marqueur.

Si un rapporteur est couplé à un marqueur indirect, par exemple une enzyme, il est nécessaire d'ajouter dans une étape ultérieure un substrat de ce marqueur indirect, par exemple un substrat de cette enzyme.

20 A titre d'exemple, si un rapporteur est couplé à la peroxydase, il est nécessaire d'ajouter dans une étape ultérieure un substrat de cette enzyme, tel que le luminol.

Dans un mode de réalisation préféré, un signal est détecté en chimiluminescence, ledit signal étant produit par un composé chimiluminescent produit par la réaction d'une enzyme peroxydase avec son substrat, par exemple le luminol, l'isoluminol et/ou un dérivé du luminol ou de l'isoluminol. Cette réaction d'une enzyme peroxydase avec son substrat nécessite généralement également la présence d'un oxydant et, le cas échéant, d'un médiateur d'électrons.

Généralement, la réaction de chimiluminescence est effectuée au moyen d'un kit comprenant au moins deux solutions.

30 La première solution comprend le substrat de la peroxydase, par exemple le luminol, l'isoluminol et/ou un dérivé du luminol ou de l'isoluminol, et un médiateur d'électrons ; la deuxième solution comprend un oxydant. A titre d'exemple, il est possible d'utiliser le kit « Immun-star western C » (Bio-Rad, Etats-Unis), « ELISTAR ETA C Ultra ELISA » (Cyanagen, Italie), « Supersignal West Pico » (Thermo Scientific, Etats-Unis),
35 « Chemiluminescent Sensitive Plus HRP » (Surmodics, Etats-Unis).

Support solide approprié pour une analyse multiplexe sécurisée

Le ou les supports utilisés pour la mise en œuvre du procédé d'analyse selon l'invention sont des supports solides.

5 Un support solide peut être en toute matière appropriée pour la mise en œuvre du procédé d'analyse.

Un support solide est par exemple un support à base d'un polymère ou d'un mélange de polymères. Un support solide approprié selon l'invention est, par exemple, un support en polystyrène, polypropylène, poly(méth)acrylate, polybutadiène ou leurs combinaisons.

10 Un autre type de support solide approprié selon l'invention est par exemple un support inorganique, tel que le verre, et/ou un support métallique.

Un support peut être sous la forme d'une plaque, d'une microplaque, d'une lame, de billes, d'une membrane.

15 Un autre exemple de support solide approprié est une membrane, par exemple une membrane en nitrocellulose, PVDF (Polyfluorure de vinylidène), nylon ou leurs combinaisons.

Un support solide préféré est en polystyrène ou polypropylène.

20 Dépendant de la technologie utilisée, le procédé d'analyse multiplexe peut être effectué au moyen d'un seul support solide, par exemple un support solide comprenant au moins un compartiment, ledit compartiment comprenant au moins deux spots, ou sur un ensemble de supports solides, par exemple un ensemble de billes.

25 Les contrôles selon l'invention sont transposables à une utilisation sur un seul support solide ou sur un ensemble de supports solides. Dans le premier cas, les contrôles et les moyens de détection des analytes sont sous forme de spots et dans le deuxième cas, les contrôles et les moyens de détection des analytes sont sous forme de billes.

30 Les billes (que l'on peut également appeler « particules », « microbilles » ou « microparticules ») peuvent être en solution ou suspension ou fixées sur un autre support solide, par exemple une plaque, une microplaque, une lame, ou une membrane, et en particulier fixées au fond d'un ou plusieurs puits d'un support solide (par exemple d'une microplaque).

35 Selon le(s) support solide utilisé(s), un contrôle du dépôt de l'échantillon est appelé spot pour contrôler le dépôt d'un échantillon ou bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon; un contrôle du dépôt d'un ou plusieurs ligand(s) de détection d'un analyte est appelé spot pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte ou bille pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte ; et un contrôle de dépôt d'un

rapporteur est appelé spot pour contrôler le dépôt d'un rapporteur ou bille pour contrôler le dépôt d'un rapporteur.

Dans un mode de réalisation préféré, le ou les supports solides sont appropriés pour la mise en œuvre d'une analyse multiplexe sous forme d'un test immunologique de type sandwich.

Un support solide selon l'invention présente également l'avantage de pouvoir détecter des analytes indépendamment de la matrice de l'échantillon. Par exemple, la détection d'analytes présents dans le sang peut être mise en œuvre au moyen d'un support solide selon l'invention à partir d'un échantillon de sang ou d'un dérivé de sang, tel que plasma ou sérum, ou encore d'un mélange d'échantillons de sang et/ou de dérivés de sang.

Support solide approprié pour une analyse multiplexe sécurisée sur spots

La présente invention a particulièrement pour objet un support solide approprié pour une analyse multiplexe d'au moins un échantillon, comprenant au moins un compartiment, ledit compartiment comprenant au moins un spot contrôle et au moins deux spots de détection d'un analyte, caractérisé en ce que ledit spot contrôle est sélectionné dans le groupe consistant en un spot pour contrôler le dépôt d'un échantillon, un spot pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte et un spot pour contrôler le dépôt d'un rapporteur.

Un support solide comprend au moins un compartiment (appelé également zone d'analyse), de préférence au moins deux compartiments.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, un support solide comprend un unique compartiment. Ledit compartiment unique peut être un compartiment comprenant une ou plusieurs parois. Alternativement, ledit compartiment unique peut être dépourvu de parois, et s'assimiler alors au support solide lui-même. Le fond du compartiment peut alors consister en la face supérieure du support solide. Un exemple d'un tel support solide comprenant un unique compartiment comportant ou non une ou plusieurs parois est une lame ou une membrane.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention où un support solide (par exemple une lame ou une membrane) comprend un unique compartiment, typiquement, au moins un (par exemple un ou deux) support solide est utilisé par échantillon à analyser.

Lorsqu'un support solide comprend au moins deux compartiments, ils sont isolés les uns des autres, de sorte qu'ils ne communiquent pas entre eux, c'est-à-dire de sorte

que les différentes compositions ou solutions utilisées pour l'analyse ne puissent pas circuler d'un compartiment à un autre pendant l'analyse. Ainsi, une solution ajoutée dans un compartiment ne va pas dans les autres compartiments. Par exemple, le ou les compartiments comprennent ou sont constitués d'un fond et d'une ou plusieurs parois, la ou lesdites parois isolant le ou les compartiments les uns des autres de sorte qu'ils ne communiquent pas entre eux.

Un compartiment du support solide est utilisé par échantillon à analyser.

Un exemple de compartiment est un puits.

Un support solide est par exemple une microplaque.

La microplaque est typiquement une microplaque de 96 puits ou de 384 puits.

Un compartiment du support utilisé pour analyser un échantillon comprend au moins trois spots, par exemple trois spots, quatre spots ou cinq spots, ou au moins six spots, de préférence six spots, sept spots, huit spots, plus préférentiellement au moins neuf spots, par exemple neuf spots, dix spots, onze spots, douze spots, treize spots, quatorze spots, quinze spots, seize spots ou plus de seize spots.

Par « spot », on entend ici une zone d'un compartiment d'un support solide comprenant au moins un composé d'intérêt lié à la surface dudit compartiment, notamment par des interactions physico-chimiques non covalentes (en particulier de type liaisons faibles, par exemple, ioniques, van der Waals, hydrogène et/ou hydrophobe) et/ou par des liaisons covalentes.

Un spot peut comprendre, outre le ou les composé(s) d'intérêt, au moins un polymère, en particulier au moins un polymère comportant des groupes hydrophiles, par exemple au moins un hydrogel.

Par « au moins », on entend dans la présente demande un ou plusieurs, « plusieurs » signifiant en particulier deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf, dix, onze, douze, treize, quatorze, seize ou plus de seize.

Un spot correspond à une zone bien délimitée, généralement de forme sphérique ou ovale et de petite dimension, par exemple comprise de 0,0078 mm² à 5,309 mm², de préférence de 0,196 mm² à 3,142 mm², plus préférentiellement comprise de 0,503 mm² à 2,011 mm².

Un spot peut être de forme discoïdale, cylindrique ou approximativement discoïdale ou cylindrique, par exemple ovale, en particulier lorsqu'un support solide est une microplaque ou une lame.

Alternativement, un spot peut être de forme carrée ou rectangulaire (ce peut être en particulier une bande), par exemple lorsqu'un support solide est une membrane, ou de tout autre forme.

Les spots sont obtenus par des techniques bien connues de l'homme du métier, telles que celles divulguées dans les brevets US 7 470 547 B2, US 6 576 295 B2, US 5 916 524 A et US 5 743960 A.

5 Par exemple, un spot est obtenu par le dépôt d'au moins une goutte d'une solution contenant une quantité déterminée dudit ou desdits composé(s) d'intérêt à un endroit précis à la surface du compartiment.

Lorsqu'un spot comprend au moins un polymère (par exemple au moins un hydrogel), ledit spot peut être obtenu par le dépôt d'au moins une goutte d'une solution
10 contenant une quantité déterminée dudit ou desdits composé(s) d'intérêt à un endroit précis à la surface du compartiment sur laquelle ledit polymère a été déposé au préalable.

Un spot peut également être obtenu par synthèse in situ dudit ou desdits composé(s) d'intérêt à un endroit précis à la surface du compartiment. Ledit ou lesdits
15 composés d'intérêt sont dans ce cas qualifiés de sonde. Il peut s'agir d'un acide nucléique ou d'un peptide (voir par exemple le document US 5 143 854).

La surface du compartiment est également appelée « phase solide ».

Un composé d'intérêt est généralement un ligand de capture, une molécule support couplée à un marqueur indirect ou un marqueur indirect. Le ligand de capture, la
20 molécule support couplée à un marqueur indirect et le marqueur indirect sont notamment tels que définis ci-dessus.

Dans un mode de réalisation avantageux, chaque compartiment d'un support solide comprend le même nombre de spots. De plus, chaque compartiment d'un support solide peut comprendre le même nombre de spots et la même composition en spots.

25 Dans un autre mode de réalisation avantageux, un support peut comprendre un ou plusieurs compartiments sans spot, ou encore avec un nombre et/ou une composition de spots différent(s). Une partie ou la totalité d'un support peut par exemple comprendre au moins deux groupes distincts (ou types) de spots ou de compartiments, chacun des groupes distincts ayant un nombre et/ou une composition de spots différent(s).

30 Un compartiment comprend au moins un spot contrôle (par exemple au moins un spot pour contrôler le dépôt d'un échantillon), de préférence au moins deux spots contrôle, et au moins deux spots de détection d'un analyte.

Un compartiment comprend généralement au moins un spot par analyte à détecter, chaque analyte pouvant par exemple correspondre à une infection ou une
35 maladie à détecter, à l'évolution d'une infection ou maladie, à une condition (pathologique ou non) d'un sujet, à un risque de développer une condition (pathologique ou non) ou

encore à un marqueur de résistance à un traitement. Plusieurs spots d'un compartiment peuvent également être destinés à l'analyse d'un même analyte.

Un même spot peut comprendre plusieurs ligands de capture différents (par exemple plusieurs anticorps et/ou antigènes), qui sont généralement spécifiques d'une même infection ou maladie à détecter (en particulier spécifiques d'un même virus, d'une même bactérie ou d'un même parasite), ou spécifiques d'une même évolution d'une infection ou maladie, d'une même condition (pathologique ou non) d'un sujet, d'un même risque de développer une condition (pathologique ou non) ou d'un même marqueur de résistance à un traitement.

La présente invention a particulièrement pour objet un support solide approprié pour une analyse multiplexe d'au moins un échantillon, comprenant au moins un compartiment, ledit compartiment comprenant au moins deux spots contrôle et au moins deux spots de détection d'un analyte, caractérisé en ce que lesdits spots contrôle sont sélectionnés dans le groupe consistant en un spot pour contrôler le dépôt d'un échantillon, un spot pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte et un spot pour contrôler le dépôt d'un rapporteur.

Un support solide selon l'invention permet une analyse multiplexe sécurisée.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention a pour objet un support solide approprié pour une analyse multiplexe d'au moins un échantillon, comprenant au moins un compartiment, ledit compartiment comprenant au moins deux spots contrôle et au moins deux spots de détection d'un analyte, caractérisé en ce que lesdits spots contrôle sont sélectionnés parmi un spot pour contrôler le dépôt d'un échantillon et un spot pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte.

Le ou les compartiments du support solide peuvent par exemple comprendre au moins deux spots pour contrôler le dépôt d'un échantillon ou au moins deux spots pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte.

Dans un mode de réalisation préféré, le ou les compartiments du support solide comprennent au moins un spot pour contrôler le dépôt d'un échantillon et au moins un spot pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte.

Comme expliqué ci-dessus, en cas de marquage indirect d'au moins un ligand de détection, il est utile que le ou les compartiments comprennent au moins un spot pour contrôler le dépôt d'un rapporteur.

La présente invention a également pour objet un support solide approprié pour une analyse multiplexe d'au moins un échantillon, comprenant au moins un compartiment, ledit compartiment comprenant au moins un spot pour contrôler le dépôt d'un échantillon, au moins un spot pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte, au moins

un spot pour contrôler le dépôt d'un rapporteur, et au moins deux spots de détection d'un analyte.

5 Le ou les compartiments du support solide peuvent donc comprendre plusieurs spots pour contrôler le dépôt d'un rapporteur, par exemple deux ou trois spots pour contrôler le dépôt d'un rapporteur, pour des analyses impliquant au moins deux marqueurs indirects différents. Dans un tel cas, chaque spot pour contrôler le dépôt d'un rapporteur est spécifique d'un marqueur.

Ensemble de billes approprié pour une analyse multiplexe sécurisée

10 Lorsqu'un support solide est une bille, le procédé d'analyse multiplexe d'un échantillon est réalisé avec un ensemble de billes.

La présente invention a ainsi également pour objet un ensemble de billes approprié pour une analyse multiplexe d'un échantillon, comprenant au moins une bille contrôle et au moins deux billes de détection d'un analyte, caractérisé en ce que la bille contrôle est sélectionnée dans le groupe consistant en une bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon, une bille pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte et une bille pour contrôler le dépôt d'un rapporteur.

Par « au moins une bille X », on entend, dans la présente demande, au moins une bille X ou au moins un type (ou groupe) de billes X, « bille X » pouvant signifier « bille contrôle », « bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon », « bille pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte » ou « bille pour contrôler le dépôt d'un rapporteur ».

Un « type de billes » (ou « groupe de billes ») au sens de l'invention comprend ou consiste en plusieurs billes (par exemple 10, 50, 100, 200, 300 ou 500 billes), qui sont identiques entre elles ou du moins en plusieurs billes à la surface desquelles sont fixés le ou les mêmes composés d'intérêt.

De façon similaire, par « au moins deux billes X », on entend, dans la présente demande, respectivement, au moins deux billes X ou au moins deux types (ou « groupes ») distincts de billes X, « bille X » pouvant signifier « bille contrôle », « bille de détection d'un analyte », « bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon », «bille pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte » ou «bille pour contrôler le dépôt d'un rapporteur ».

Chaque bille est également recouverte d'au moins un composé d'intérêt lié à la surface de la bille, appelée également « phase solide ».

Un ensemble de billes utilisé pour analyser un échantillon comprend au moins trois billes (ou types de billes), par exemple trois, quatre ou cinq billes (ou types de billes), ou au moins six billes (ou types de billes), de préférence six, sept, huit billes (ou types de

billes), plus préférentiellement au moins neuf billes (ou types de billes), par exemple neuf, dix, onze, douze, treize, quatorze, quinze billes ou seize billes (ou types de billes), ou plus de seize billes (ou types de billes).

5 Par « bille », « particule », « microbille » ou « microparticule », on entend dans la présente demande toute particule, de préférence de forme sphérique ou approximativement sphérique, de taille pouvant être comprises de 0,3 μm à 100 μm de diamètre, de préférence de 0,5 μm à 40 μm . De telles particules sont fabriquées par exemple par les sociétés Luminex, Merck et Dynal. Une bille pouvant être utilisée dans le cadre de la présente invention peut également être une particule en forme de cube ou de pavé ou approximativement en forme de cube ou de pavé, dont la longueur des cotés serait par exemple comprise de 0,3 μm à 100 μm , de préférence de 0,5 μm à 40 μm .

10 Une bille selon l'invention est de préférence constituée d'un ou plusieurs polymères inertes vis à vis des constituants des échantillons biologiques; elle est solide et insoluble dans les échantillons à analyser. Des exemples de polymère inerte pouvant être utilisés sont un polyester, polyéther, polyoléfine, polyamide, polysaccharide, polyuréthane ou cellulose.

Un ou plusieurs groupes fonctionnels peuvent être incorporés avec le ou lesdits polymères inertes pour permettre la fixation ou le couplage d'un ou de plusieurs composés d'intérêt (par exemple protéines, peptides, glycoprotéines, lipides, glucides ou acides nucléiques). Ces groupes fonctionnels, connus de l'homme du métier, peuvent être sélectionnés dans le groupe consistant en des fonctions amines (-NH₂) ou ammonium (-NH₃⁺ ou -NHR, R représentant une chaîne aliphatique, de préférence une chaîne :

- alkyle de 1 à z atomes de carbone, linéaire ou ramifiée (substituée ou non), z étant de préférence un nombre entier compris de 1 à 20,
- 25 - alcényle de 2 à z atomes de carbone linéaire ou ramifiée, z étant de préférence un nombre entier compris de 1 à 20, ou
- un radical aryl),

des fonctions alcooliques (-OH), des fonctions carboxyliques (-COOH), des fonctions isocyanates (-NCO), des fonctions thiol (SH) ou des fonctions epoxy. Les monomères les plus couramment utilisés pour introduire des fonctions carboxyliques -COOH dans les polyoléfines sont l'acide acrylique ou l'acide méthacrylique.

30 Une bille est en effet recouverte avec un ou plusieurs composés d'intérêt, en utilisant toute méthode appropriée bien connue de l'homme du métier. La fixation du ou des composés d'intérêt sur la surface d'une bille peut se faire par attraction électrostatique, interaction d'affinité, interaction hydrophobe et/ou couplage covalent.

Dans un mode de réalisation préféré, le ou les composés d'intérêt sont fixés à la surface de la bille par couplage covalent.

Les méthodes de fixation d'un ou de plusieurs composés à la surface d'une bille sont bien connues de l'homme du métier (cf. par exemple LUMINEX xMAP® Antibody Coupling Kit User Manual, l'article de Joseph Dasso et al. (*Journal of Immunological Methods* 263 (2002) 23– 33) ou le document WO1997/014028).

Par exemple, dans le cas d'une bille comprenant des fonctions chimiques carboxyles à sa surface, ces fonctions chimiques peuvent être converties en une forme ester activée par une réaction avec le 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride et le N-hydroxysulfosuccinimide. Un composé d'intérêt, tel qu'un anticorps, une protéine ou un peptide, peut alors être greffé, par un groupe amine libre présent sur ledit composé d'intérêt, sur les groupements ester activés de chaque bille. La conversion en une forme ester activé et le couplage du composé d'intérêt sur une bille sont réalisés selon des procédures bien connues de l'homme du métier (cf. par exemple US 7 141 362).

Les billes ou une partie des billes d'un ensemble de billes sont de préférence des billes magnétiques, telles que des billes de la technologie Luminex xMAP®, afin de permettre la récupération des billes entre les différentes étapes du procédé, et notamment à l'issue des étapes de lavage.

Chaque bille est marquée par un code de manière à pouvoir la différencier des autres billes de l'ensemble de billes, par exemple par un code en fluorescence ou un code-barres.

Le marquage d'une bille avec un code, par exemple en fluorescence ou un code-barres, peut être réalisé par toute méthode appropriée bien connue de l'homme du métier, par exemple comme décrit dans les documents EP 1 802 710 et EP 1 049 807.

Comme pour un support solide comprenant au moins un compartiment, un composé d'intérêt est généralement un ligand de capture, une molécule support couplée à un marqueur indirect, ou un marqueur indirect. Le ligand de capture, la molécule support couplée à un marqueur indirect et le marqueur indirect sont notamment tels que définis ci-dessus.

L'ensemble de billes selon l'invention comprend une bille (ou un type de billes) par contrôle souhaité et au moins une bille (ou au moins un type de billes) par analyte à détecter. Plusieurs billes (ou un types de billes) peuvent également être destinées à la détection d'un même analyte.

Une même bille (ou chaque bille d'un type de billes donné) peut être recouverte de plusieurs ligands de capture différents (par exemple plusieurs anticorps et/ou antigènes),

qui sont généralement spécifiques d'une même infection à détecter, et en particuliers spécifiques d'un même virus, d'une même bactérie ou d'un même parasite.

L'ensemble de billes comprend donc au moins une bille contrôle (par exemple au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon), de préférence au moins deux billes contrôle, et au moins deux billes de détection d'un analyte.

Au moins un ensemble de billes est utilisé par échantillon à analyser.

La présente invention a particulièrement pour objet un ensemble de billes approprié pour une analyse multiplexe d'un échantillon, comprenant au moins deux billes contrôle et au moins deux billes de détection d'un analyte, caractérisé en ce que lesdites billes contrôle sont sélectionnées dans le groupe consistant en une bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon, une bille pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte et une bille pour contrôler le dépôt d'un rapporteur.

Dans un mode de réalisation avantageux, la présente invention a pour objet un ensemble de billes approprié pour une analyse multiplexe d'un échantillon, comprenant au moins deux billes contrôle et au moins deux billes de détection d'un analyte, caractérisé en ce que lesdites billes contrôle sont choisies parmi une bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon et une bille pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte.

L'ensemble de billes peut, par exemple, comprendre au moins deux billes pour contrôler le dépôt d'un échantillon ou au moins deux billes pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte.

Dans un mode de réalisation préféré, l'ensemble de billes comprend au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon et au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte.

Comme expliqué ci-dessus, en cas de marquage indirect d'au moins un ligand de détection d'un analyte, il est avantageux d'utiliser au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un rapporteur.

La présente invention a également pour objet un ensemble de billes approprié pour une analyse multiplexe d'un échantillon, comprenant au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon, au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte, au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un rapporteur et au moins deux billes de détection d'un analyte.

L'ensemble de billes peut donc comprendre au moins deux billes pour contrôler le dépôt d'un rapporteur, par exemple deux ou trois billes pour contrôler le dépôt d'un rapporteur, pour des analyses impliquant au moins deux marqueurs indirects différents.

Dans un tel cas, chaque bille pour contrôler le dépôt d'un rapporteur est de préférence spécifique d'un marqueur.

L'ensemble de billes selon l'invention permet une analyse multiplexe sécurisée.

5 Contrôle du dépôt d'un échantillon

Le contrôle du dépôt d'un échantillon permet de vérifier la mise en présence de l'échantillon avec les spots d'un compartiment du support solide ou avec un ensemble de billes.

10 Le contrôle du dépôt d'un échantillon comprend au moins un ligand de capture, en particulier un anticorps ou un antigène, spécifique d'un composé contrôle naturellement présent dans l'échantillon à l'analyser. Le composé contrôle est notamment tel que défini ci-dessus.

Ainsi, un signal détecté au niveau du contrôle du dépôt d'un échantillon permet de valider l'étape de dépôt de l'échantillon.

15 Le dépôt d'un échantillon consiste à ajouter l'échantillon à analyser dans un compartiment du support solide selon l'invention comprenant au moins un spot contrôle et au moins deux spots de détection d'analytes ou à mettre en présence l'échantillon avec au moins un ensemble de billes selon l'invention.

20 Un composé contrôle se fixe alors au ligand de capture au niveau du contrôle de dépôt de l'échantillon. Un composé contrôle ainsi fixé peut être détecté par un ligand de détection spécifique du composé contrôle.

25 De préférence, un ligand de détection d'un composé contrôle est spécifique d'une zone du composé contrôle éloignée de la zone du composé contrôle à laquelle se lie spécifiquement le ligand de capture utilisé, de manière à éviter une compétition du ligand de capture et du ligand de détection vis-à-vis du composé contrôle, en raison d'un encombrement stérique.

30 Lorsqu'un composé contrôle est un complexe d'au moins deux molécules, le ligand de détection ou un des ligands de détection peut être spécifique d'une des deux molécules et le ligand de capture ou un des ligands de capture spécifique de l'autre molécule du complexe.

35 Alternativement, lorsqu'un composé contrôle est un complexe d'au moins deux molécules, le ligand de détection ou un des ligands de détection et le ligand de capture ou un des ligands de capture peuvent être spécifiques de la même molécule, et même de la même zone de cette molécule, lorsque le complexe comprend au moins deux de ces molécules identiques, permettant ainsi la fixation simultanée de l'anticorps de détection et de l'anticorps de capture sur le complexe.

Par exemple, lorsqu'un composé contrôle est le récepteur soluble de la transferrine complexé à la transferrine, un contrôle de dépôt peut comprendre, en tant que ligand de capture, un anticorps spécifique soit de la transferrine, soit du récepteur soluble de la transferrine. De préférence, le ligand ou un des ligands de capture est un anticorps spécifique du récepteur soluble de la transferrine, afin d'éviter des interférences avec la transferrine libre pouvant se trouver dans un échantillon de sang.

Dans un mode de réalisation préféré, le ligand ou un des ligands de capture du contrôle de dépôt est spécifique du récepteur soluble de la transferrine et le ligand de détection ou un des ligands de détection du ou d'un composé contrôle est soit spécifique de la transferrine, soit spécifique du récepteur soluble de la transferrine.

Dans certains modes de réalisation, un contrôle du dépôt d'un échantillon permet également de vérifier qu'un ou plusieurs ligands de détection d'analytes ont été mis en présence avec les spots d'un compartiment d'un support solide ou avec un ensemble de billes, lorsque ledit ou lesdits ligands de détection d'analytes ne sont pas ajoutés en même temps que l'échantillon à analyser, mais par exemple à une étape ultérieure, simultanément à l'ajout du ou des ligands de détection du composé contrôle. Par « simultanément à l'ajout du ou des ligands de détection du composé contrôle », on entend généralement que ledit ou lesdits ligands de détection d'analytes sont ajoutés sous la forme d'une solution comprenant ledit ou lesdits ligands de détection d'analytes et le ou les ligands de détection du composé contrôle.

Alternativement ledit ou lesdits ligands de détection d'analytes et ledit ou lesdits ligands de détection du composé contrôle peuvent être ajoutés à la même étape mais sous la forme de solutions distinctes.

En effet, lorsqu'un échantillon à analyser comprend un composé qui pourrait interférer avec le ligand de détection du composé contrôle, il peut être nécessaire d'ajouter le ligand de détection du composé contrôle dans une étape ultérieure à l'étape de dépôt de l'échantillon, en particulier après l'étape de dépôt de l'échantillon suivie d'au moins une étape de lavage. Dans ce cas, tout ou partie des ligands de détection des analytes peuvent être ajoutés en même temps que le ligand de détection du composé contrôle. Le contrôle de dépôt permet alors également de valider la mise en présence de ces ligands de détection des analytes avec les spots d'un compartiment du support solide ou avec l'ensemble de billes.

Par exemple, un échantillon de sang comprend à la fois le récepteur soluble de la transferrine complexé à la transferrine et de la transferrine libre, c'est-à-dire non liée au récepteur. Ainsi, si le ligand ou un des ligands de détection est un anticorps spécifique de la transferrine et qu'il est ajouté en même temps que l'échantillon, il risquerait de se lier en

partie à la transferrine libre et la détection du composé contrôle serait faussée. Dans un tel cas, ledit ligand de détection du composé contrôle est apporté dans une étape ultérieure, c'est-à-dire après l'étape de dépôt de l'échantillon suivie d'au moins une étape de lavage.

5 Dans un mode de réalisation particulier, le ou les contrôles du dépôt d'un échantillon ne comprennent pas un anticorps spécifique du facteur XIII (i.e. ni un anticorps spécifique de la forme tétramérique, ni un anticorps spécifique d'une sous-unité du facteur XIII). De préférence, le ou les contrôles du dépôt d'un échantillon ne comprennent pas un ligand de capture spécifique du facteur XIII (i.e. ni un ligand de capture spécifique de la forme tétramérique, ni un ligand de capture spécifique d'une sous-unité du facteur XIII).

10 Dans un mode de réalisation particulier, le ou les contrôles du dépôt d'un échantillon ne comprennent pas un ligand de capture spécifique (en particulier un anticorps spécifique) d'une IgG, d'une IgM ou plus généralement d'une immunoglobuline (en particulier une IgG humaine, une IgM humaine ou une immunoglobuline humaine).

15 Il peut être avantageux d'utiliser au moins deux contrôles du dépôt d'un échantillon, ces contrôles détectant des composés contrôles différents et/ou un même composé contrôle mais avec des sensibilités différentes, par exemple lorsque la concentration du composé contrôle peut varier, par exemple en fonction de la nature de l'échantillon et/ou de la condition du sujet dont est issu l'échantillon.

Contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte

25 Le contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte permet de vérifier la mise en présence d'un ou des ligands de détection d'analytes déposés simultanément au ligand de détection d'un additif et/ou d'un ou des ligands de détection d'analytes déposés simultanément à un additif, avec les spots d'un compartiment d'un support solide ou avec un ensemble de billes.

30 Par « déposés simultanément au ligand de détection d'un additif », on entend généralement que ledit ou lesdits ligands de détection d'analytes sont ajoutés sous la forme d'une solution comprenant ledit ou lesdits ligands de détection d'analytes et le ou les ligands de détection d'un additif. Alternativement ledit ou lesdits ligands de détection d'analytes et/ou le ou les ligands de détection d'un additif peuvent être ajoutés à la même étape mais sous la forme de solutions distinctes.

35 Par « déposés simultanément à un additif », on entend généralement que ledit ou lesdits ligands de détection d'analytes sont ajoutés sous la forme d'une solution comprenant ledit ou lesdits ligands de détection d'analytes et un additif. Alternativement

ledit ou lesdits ligands de détection d'analytes et/ou un ou des additifs peuvent être ajoutés à la même étape mais sous la forme de solutions distinctes.

Le contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte permet également de vérifier les étapes d'incubation et de lavage. En effet, la concentration de l'additif mis en présence des spots d'un compartiment du support solide ou d'un ensemble de billes étant connue, une variation du signal détecté permet d'identifier une déficience du procédé au niveau des étapes du procédé, et notamment des étapes d'incubation et de lavage. Cela peut notamment permettre d'éviter des « faux positifs » résultant d'étapes d'incubation et/ou d'étapes de lavage déficientes, c'est-à-dire non réalisées ou mal réalisées.

Un « faux positif » est un résultat positif traduisant la présence d'un ou de plusieurs analytes à détecter dans un échantillon, alors que ledit ou lesdits analytes n'étaient pas présents dans l'échantillon et n'auraient donc pas dû être détectés.

Le contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte comprend au moins un ligand de capture spécifique d'un additif qui n'est pas présent dans l'échantillon à analyser et qui est utilisé lors de la mise en œuvre du procédé d'analyse multiplexe. Un additif est notamment tel que défini ci-dessus.

Ainsi, un signal détecté au niveau du contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte permet de valider l'étape de dépôt du ou des ligands de détection d'analytes déposés en même temps que le ligand de détection d'un additif.

Un additif mis en présence des spots et/ou d'un ensemble de billes se fixe au ligand de capture au niveau du contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte. Un additif ainsi fixé peut être détecté par un ligand de détection spécifique dudit additif.

Par exemple, lorsqu'un additif comprend de la digoxigénine, un ligand de capture du contrôle de procédé peut être un anticorps spécifique de la digoxigénine. De préférence, un ligand de détection d'un l'additif est également un anticorps spécifique de la digoxigénine.

Il peut être avantageux d'utiliser plusieurs contrôles du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte différents et donc autant d'additifs différents, par exemple si les ligands de détection des analytes sont ajoutés à plusieurs étapes différentes, en particulier au cours d'au moins trois étapes différentes.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention,

- un composé contrôle qui se fixe à un ligand de capture d'un contrôle de dépôt d'un échantillon lors de la mise en œuvre du procédé d'analyse de l'invention est détecté

par un ligand de détection spécifique dudit composé contrôle (format immunologique de type sandwich), et

- un additif qui se fixe à un ligand de capture d'un contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte lors de la mise en œuvre du procédé d'analyse est détecté par un ligand de détection spécifique dudit additif (format immunologique de type sandwich).

Ces formats immunologiques de type sandwich permettent d'atteindre un haut niveau de spécificité et/ou de sensibilité, par comparaison à d'autres formats immunologique et en particulier des formats indirects.

10 Contrôle du dépôt d'un rapporteur

Le contrôle du dépôt d'un rapporteur permet de vérifier la mise en présence d'un rapporteur de marqueur de détection avec les spots d'un compartiment d'un support solide ou avec un ensemble de billes.

- Le contrôle du dépôt d'un rapporteur n'a un intérêt qu'en cas de marquage indirect d'au moins un ligand de détection d'un analyte.

Le contrôle du dépôt d'un rapporteur comprend un marqueur indirect ou une molécule support couplée à un marqueur indirect.

Le marqueur indirect du contrôle du dépôt d'un rapporteur est identique au marqueur indirect couplé à au moins un ligand de détection d'un analyte.

- Si au moins deux marqueurs indirects différents sont utilisés pour détecter au moins deux ligands de détection d'analytes, il est préférable d'utiliser un contrôle du dépôt d'un rapporteur pour chaque marqueur.

- Dans un mode de réalisation avantageux selon l'invention, un seul et même marqueur indirect est utilisé pour le marquage du ou des ligands de détection, et donc un seul contrôle du dépôt d'un rapporteur peut être utilisé.

Ainsi, un signal détecté au niveau du contrôle du dépôt d'un rapporteur permet de valider l'étape de dépôt du rapporteur du marqueur de détection correspondant.

- Le rapporteur se fixe ainsi au marqueur de détection au niveau du contrôle du dépôt d'un rapporteur et un signal est obtenu, si nécessaire après ajout d'un substrat du marqueur dudit rapporteur, en cas de contrôle du dépôt d'un rapporteur positif.

Par exemple, lorsque le marqueur indirect est la biotine, le contrôle du dépôt d'un rapporteur comprend de la biotine ou une molécule support couplée à de la biotine.

Procédé d'analyse multiplexe sécurisée

- La présente invention a ainsi pour objet un procédé d'analyse multiplexe pour la détection d'au moins n analytes dans au moins un échantillon, n étant un nombre entier

supérieur ou égal à 2, ledit procédé comprenant au moins les étapes a), c) et e), au moins les étapes a), c) et f) ou au moins les étapes a), b), c) et d) suivantes :

- 5 a) fournir au moins un support solide comprenant au moins un compartiment tel que défini ci-dessus ou au moins un ensemble de billes tel que défini ci-dessus,
- b) mettre en présence des spots dudit compartiment ou dudit ensemble de billes : l ligands de détection de p analytes à détecter et, le cas échéant, au moins un additif, l étant de préférence supérieur ou égal à p,
- 10 c) mettre un échantillon à analyser en présence des spots dudit compartiment ou dudit ensemble de billes,
- d) mettre en présence des spots dudit compartiment ou dudit ensemble de billes : l' ligands de détection de m analytes à détecter et, le cas échéant, au moins un ligand de détection dudit ou desdits additifs, l' étant de préférence supérieur ou égal à m,
- 15 e) mettre en présence des spots dudit compartiment ou dudit ensemble de billes : au moins un ligand de détection d'un composé contrôle et l'' ligands de détection de y analytes à détecter, l'' étant de préférence supérieur ou égal à y, et
- 20 f) éventuellement mettre au moins un rapporteur en présence des spots dudit compartiment ou dudit ensemble de billes,
- g) éventuellement, en particulier lorsque ledit ou un desdits rapporteurs de l'étape f est couplé à un marqueur, en particulier à un marqueur indirect (par exemple une enzyme), mettre au moins un deuxième rapporteur dudit marqueur couplé au rapporteur de l'étape f) (par exemple un substrat, tel que le luminol, l'isoluminol ou un de leurs dérivés) en présence des spots dudit compartiment ou dudit ensemble de billes,
- 25 l, l', l'', m, p et y étant des nombres entiers supérieurs ou égaux à 0 et la somme $m+p+y$ étant supérieure ou égale à 1.

30 Un procédé pour la détection d'au moins n analytes peut consister à détecter un nombre d'analytes différents qui est inférieur à n, lorsqu'au moins deux analytes à détecter sont identiques. Par exemple, au moins deux spots d'un compartiment d'un support solide ou au moins deux billes (ou types de billes) d'un ensemble de billes sont destinés à la détection d'un même analyte.

Le nombre « n » est généralement égal au nombre de spots de détection d'un analyte d'un compartiment d'un support solide ou au nombre de billes (ou types de billes) de détection d'un analyte d'un ensemble de bille.

De préférence, la somme $m+p+y$ est comprise de 1 à n.

5 Lorsque plusieurs analytes à détecter sont identiques, il est possible d'utiliser un même ligand de détection pour au moins deux ou la totalité des analytes identiques. La somme $m+p+y$ peut alors être supérieure ou égale à 1 et strictement inférieur à n.

10 Dans un autre mode de réalisation, la somme $m+p+y$ est égale à n, par exemple lorsqu'il y a n spots de détection d'un analyte dans un compartiment d'un support solide ou n billes (ou types de billes) de détection d'un analyte d'un ensemble de bille.

15 Comme détaillé ci-après, les étapes a) à e) peuvent être réalisées simultanément et/ou successivement (par exemple, certaines de ces étapes peuvent être réalisées simultanément alors que d'autres sont réalisées successivement), au moins pour deux d'entre elles dans l'ordre a) à e) ou dans un autre ordre, l'étape a) étant toujours la première étape réalisée ; lorsque le procédé comprenant l'étape f) et éventuellement l'étape g), ces étapes sont toujours réalisées ultérieurement aux étapes a) à e).

20 Lorsque le procédé comprend au moins les étapes a), c) et e), un support solide comprend au moins un compartiment, ledit compartiment comprenant au moins un spot pour contrôler le dépôt d'un échantillon, ou un ensemble de billes comprend au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon.

25 Lorsque le procédé comprend au moins les étapes a), c) et f), un support solide comprend au moins un compartiment, ledit compartiment comprenant au moins un spot pour contrôler le dépôt d'un rapporteur, ou un ensemble de billes comprend au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un rapporteur.

Lorsque l'étape b) comprend la mise en présence des spots ou de l'ensemble de billes avec au moins un additif, l'étape d) comprend, de préférence, la mise en présence des spots ou de l'ensemble de billes avec au moins un ligand de détection dudit ou desdits additifs

30 Lorsque le procédé comprend au moins les étapes a), b), c) et d), au moins un additif étant mis en présence des spots ou de l'ensemble de billes à l'étape b) et au moins un ligand de détection dudit ou desdits additifs étant mis en présence des spots ou de l'ensemble de billes à l'étape d), un support solide comprend au moins un compartiment, ledit compartiment comprenant au moins un spot pour contrôler le dépôt d'un ligand de
35 détection d'un analyte, ou un ensemble de billes comprend au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte.

L'expression « mettre un composé X en présence des spots d'un compartiment » signifie que le composé X est ajouté dans un compartiment comprenant lesdits spots, ledit compartiment étant destiné à analyser un échantillon.

5 L'expression « mettre un composé X en présence d'un ensemble de billes » signifie que le composé X est mis en présence d'au moins un ensemble de billes destiné à analyser un échantillon dans tout récipient approprié contenant ledit ensemble de billes. Un exemple de récipient approprié est un microtube, une microplaque ou une cuve réactionnelle.

10 Lorsqu'au moins deux des étapes b) à f) sont réalisées simultanément, le, les ou des composés X peuvent être mis séparément en présence du ou des spots d'un compartiment ou de la ou des billes ou du ou des ensembles de billes destinés à analyser un échantillon, c'est-à-dire sous la forme de compositions distinctes. Alternativement, ces composés X ou certains de ces composés X peuvent être mis en présence du ou des spots d'un compartiment ou de la ou des billes ou du ou des ensembles de billes destinés à analyser un échantillon sous la forme d'un ou plusieurs mélanges.

15 Les différents composés sont mis en présence des spots de chaque compartiment ou de chaque ensemble de billes pendant une certaine durée, par exemple de 1 seconde à 2 heures, de préférence 1 minute à 1 heure, plus préférentiellement 5 minutes à 50 minutes, plus préférentiellement encore de 10 minutes à 40 minutes.

20 L'homme du métier sait déterminer la température appropriée pour chaque étape d'incubation. La température d'une incubation peut par exemple être de 4°C, une température comprise de 19°C à 24°C, 37°C ou 40°C.

25 Les différents constituants utilisés au cours des étapes b), d), e), f) et g) sont bien connus de l'homme du métier. Ils permettent par exemple la formation de complexes antigènes-anticorps, marqueur-rapporteur.

Le procédé d'analyse multiplexe selon l'invention est donc mis en œuvre soit en utilisant un support solide avec compartiment(s), par exemple de type microplaque, soit avec un ensemble de billes.

Pour x échantillons à analyser, l'étape a) consiste à fournir :

- 30
- un support solide comprenant au moins x compartiments ou encore plusieurs supports solide de manière à avoir au moins x compartiments avec l'ensemble des supports solides (par exemple, lorsqu'un support solide ne comporte qu'un seul compartiment, qui peut, dans un mode de réalisation particulier, s'assimiler au support solide lui-même, fournir au moins x supports solides), ou
 - 35 - au moins x ensembles de billes.

Le procédé d'analyse multiplexe selon l'invention permet par exemple la détection de n analytes dans au moins 1 échantillon, au moins deux échantillons, au moins 5 échantillons, au moins 10 échantillons, de préférence au moins 20 échantillons, par exemple au moins 40 échantillons, au moins 60 échantillons ou encore au moins 80 échantillons.

Le nombre n est un nombre entier supérieur ou égal à 2, par exemple 2, 3, 4, 5, de préférence supérieur ou égal à 6, par exemple 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou supérieur à 18.

Lorsque des étapes ne sont pas réalisées simultanément, elles sont généralement suivies d'une ou plusieurs étapes de lavage.

Une étape de lavage permet d'éliminer les composés non liés aux spots ou aux billes ou aux différents composés liés auxdits spots ou auxdites billes.

Typiquement, une étape de lavage consiste en au moins un cycle, de préférence au moins deux cycles, plus préférentiellement 3 à 6 cycles, de distribution (par exemple un volume de 400 µL) et aspiration d'une solution de lavage dans chaque compartiment ou en présence de chaque ensemble de billes. Typiquement, la solution de lavage peut être un tampon Tris NaCl 0,01M, pH 7,4 additionné de Tween 20 à 0,1%.

Lorsque le procédé est mis en œuvre avec au moins un support solide comprenant au moins deux compartiments, les compartiments du ou des supports solides sont, de préférence, identiques, en particulier en termes de nombre et composition des spots.

Alternativement, le procédé peut être mis en œuvre avec au moins un support solide comprenant au moins deux groupes distincts (ou types) de compartiments, chacun des groupes distincts ayant un nombre et/ou une composition de spots différent(s).

Lorsque le procédé est mis en œuvre avec au moins deux ensembles de billes, les ensembles de billes peuvent être identiques, en particulier en termes de nombre et composition des billes.

Alternativement, le procédé peut être mis en œuvre avec au moins deux groupes distincts (ou types) d'ensembles de billes différents, en particulier chacun des groupes distincts d'ensembles de billes ayant un nombre et/ou composition de billes différent(s).

Les étapes b), d), e) et f) sont réalisées dans chaque compartiment destiné à analyser un échantillon ou dans chaque récipient contenant un ensemble de billes destiné à analyser un échantillon.

S'agissant de l'étape c), un échantillon est ajouté par compartiment ou par récipient contenant un ensemble de billes.

Le ou les échantillons, les analytes, le ou les additifs, le ou les composés contrôle, les ligands de détection des analytes, le ou les ligands de détection du ou des additifs, le ou les ligands de détection du ou des composés contrôle et le ou les rapporteurs sont notamment tels que définis ci-dessus dans les paragraphes correspondants.

5 Un additif utilisé dans le procédé selon l'invention est un additif reconnu par le ou les ligands de capture du contrôle de dépôt d'un ligand de détection d'un analyte.

Un composé contrôle présent dans l'échantillon est un composé contrôle reconnu par le ou les ligands de capture du contrôle du dépôt d'un échantillon.

10 Chaque ligand de détection d'un analyte est spécifique d'un analyte reconnu par au moins un ligand de capture présent dans un spot de détection d'un analyte ou sur une bille de détection d'un analyte.

Lorsque l'étape b) n'est pas réalisée simultanément avec l'une des étapes c), d) ou e), une ou plusieurs étapes de lavages peuvent être réalisées après l'étape b) et avant lesdites étapes c), d) et e) uniquement lorsque l est égal à 0.

15 Les étapes b), c), d) et e), lorsqu'elles sont présentes, peuvent être réalisées dans n'importe quel ordre souhaité : successivement, ou une, deux ou ces trois étapes simultanément. Toutefois, lorsqu'une étape b) et une étape d) mettent en œuvre respectivement au moins un additif et au moins un ligand de détection dudit additif, ladite étape d) est toujours réalisée simultanément ou ultérieurement à ladite étape b). De la même façon, une étape e), lorsqu'elle est présente, est toujours réalisée simultanément ou ultérieurement à l'étape c), ou encore avant l'étape c) à condition qu'il n'y ait pas d'étape de lavage entre l'étape e) et c). Par ailleurs, lorsque l'étape c) est réalisée après une étape b) dans laquelle l est supérieur ou égal à 1 et/ou après une étape d) dans laquelle l est supérieur ou égal à 1 et/ou après l'étape e), aucune étape de lavage n'est
20
25 réalisée entre cette ou ces étapes et l'étape c).

A titre d'exemple, les étapes b) à e), lorsqu'elles sont présentes, peuvent être réalisées simultanément et/ou successivement, dans les ordres suivants : b) à e), b) c) e) d), c) b) d) e), c) b) e) d) ou c) e) b) d).

Les étapes c), d) et/ou e) peuvent être réalisées simultanément à l'étape b).

30 Dans un mode de réalisation avantageux selon l'invention, les étapes b) et c) sont réalisées simultanément.

Dans un autre mode de réalisation avantageux selon l'invention, les étapes c) et d) sont réalisées simultanément. Il peut en effet être avantageux de mettre en présence l'échantillon simultanément aux ligands de détection des analytes qui interagissent mieux
35 en solution avec l'analyte dont ils sont spécifiques que lorsque l'analyte est déjà lié à l'anticorps de capture de l'analyte.

Dans encore un autre mode de réalisation avantageux selon l'invention, les étapes b), c) et d) sont réalisées simultanément.

5 Lorsque plusieurs additifs sont utilisés, le procédé peut comporter une ou plusieurs étapes b) (et une ou plusieurs étapes d)), chacune des étapes b) pouvant être réalisée indépendamment avant, après ou simultanément à l'étape c). Il peut par exemple y avoir au moins deux étapes b), l'une étant réalisée avant ou simultanément à l'étape c), l'autre étant réalisée après ou simultanément à l'étape c).

10 Les composés d'une étape donnée peuvent être apportés sous la forme d'un mélange, c'est-à-dire d'une solution, qui comprend l'ensemble des composés de cette étape et éventuellement les composés d'une ou plusieurs étapes réalisées simultanément.

15 Lorsque deux ou plus de deux étapes sont réalisées simultanément, les composés de ces différentes étapes peuvent être apportés sous forme d'un ou plusieurs mélanges, c'est-à-dire d'une ou plusieurs solutions, de préférence sous la forme d'un seul mélange (c'est-à-dire d'une seule solution).

20 Par exemple, lorsque les étapes b), c) et d) sont réalisées simultanément, les ou les additifs (lorsqu'ils sont présents), les l ligands de détection de chacun des p analytes à détecter, le ou les ligands de détection dudit ou desdits additifs (lorsqu'ils sont présents), les l'' ligands de détection de chacun des m analytes à détecter peuvent être apportés sous la forme d'un seul mélange.

Dans un mode de réalisation avantageux, l' est égal à n, c'est-à-dire qu' au moins n ligands de détection des n analytes sont ajoutés à l'étape d).

25 Dans certains modes de réalisation, l'étape e) est réalisée postérieurement à l'étape c). Il s'agit notamment du cas où la présence du ou d'un des ligands de détection d'un composé contrôle en même temps que l'échantillon risque de provoquer des interférences.

30 Par exemple, lorsque le ligand de détection du composé contrôle est un anticorps spécifique de la transferrine et que l'échantillon comprend de la transferrine libre, l'étape e) est réalisée postérieurement à l'étape c).

Lorsque l'étape e) est réalisée postérieurement à l'étape c), de préférence au moins une étape de lavage des compartiments est réalisée après l'étape c) et avant l'étape e).

35 Lorsque le procédé selon l'invention comprend l'étape f), cette étape est toujours réalisée ultérieurement aux étapes a) à e) et elle est généralement précédée d'au moins

une étape de lavage des spots de chaque compartiment ou de chaque ensemble de billes.

Le procédé peut également comprendre plusieurs étapes f) si au moins deux contrôles de dépôt d'un rapporteur sont utilisés, à savoir de préférence une étape f) par rapporteur.

Lorsque le procédé selon l'invention comprend une étape g), cette étape est toujours réalisée ultérieurement à une étape f) et elle est généralement précédée d'au moins une étape de lavage des spots de chaque compartiment ou de chaque ensemble de billes.

Le ou au moins un des rapporteurs de l'étape f) est, de préférence, à la fois un rapporteur d'un marqueur de détection indirect couplé à au moins un ligand de détection d'un analyte et celui d'un marqueur de détection présent dans au moins un contrôle du dépôt d'un rapporteur.

Il peut être avantageux que les contrôles utilisés pour la mise en œuvre du procédé d'analyse multiplexe selon l'invention miment les différentes étapes de la détection des analytes. Par exemple, si les ligands de capture des analytes et les ligands de détection des analytes sont des anticorps, le ligand de détection de l'additif et, de préférence, le ligand de détection du composé contrôle sont également des anticorps. De même, le ligand de détection de l'additif et, de préférence, le ligand de détection du composé contrôle sont marqués avec le même marqueur que celui des ligands de détection des analytes.

Le procédé selon l'invention comprend généralement une étape h) de détection du signal correspondant aux marqueurs de détection du ou des contrôles (en particulier du ou des spots contrôle ou de la ou des billes contrôle) et du ou des analytes.

Un contrôle est positif si un signal positif est détecté à la fin du procédé.

Un contrôle est négatif en l'absence de signal positif détecté à la fin du procédé.

La détection d'un signal positif pour chaque contrôle utilisé lors de la mise en œuvre du procédé permet de valider l'ensemble du procédé.

L'absence de signal au niveau d'un ou plusieurs contrôles signifie qu'une ou plusieurs étapes ne se sont pas déroulées correctement. Dans ce cas, les résultats obtenus ne doivent pas être utilisés.

Lorsqu'un ligand de détection d'un composé contrôle est déposé ultérieurement au dépôt de l'échantillon et après au moins une étape de lavage, un contrôle du dépôt d'un échantillon négatif signifie que l'échantillon n'a pas été déposé et/ou que ledit ligand de détection d'un composé contrôle n'a pas été déposé.

Le contrôle du dépôt d'un échantillon, le contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte et, le cas échéant, le contrôle du dépôt d'un rapporteur sont complémentaires et permettent de s'assurer du bon déroulement de chacune des étapes du procédé et permettent de comprendre l'origine d'un éventuel défaut rencontré dans le procédé d'analyse.

Le procédé selon l'invention peut également comprendre :

- au moins deux étapes b) et au moins deux étapes d), lorsqu'au moins deux contrôles du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte sont utilisés,
- au moins deux étapes f), lorsqu'au moins deux contrôles du dépôt d'un échantillon sont utilisés, et/ou
- au moins deux étapes f), lorsqu'au moins deux contrôles du dépôt d'un rapporteur sont utilisés.

Utilisation d'un ou plusieurs contrôles pour sécuriser un procédé d'analyse multiplexe d'un échantillon.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un contrôle du dépôt d'un échantillon et/ou d'au moins un contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte, pour sécuriser une analyse multiplexe d'un échantillon.

La présente invention a particulièrement pour objet l'utilisation d'au moins un contrôle sélectionné dans le groupe consistant en un contrôle du dépôt d'un échantillon, un contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte et un contrôle du dépôt d'un rapporteur, pour sécuriser une analyse multiplexe d'un échantillon.

Par « sécuriser une analyse multiplexe d'un échantillon », on entend ici garantir la fiabilité des résultats d'une analyse multiplexe, en particulier en évitant la présence de « faux négatifs ».

Un « faux négatif » est un résultat négatif traduisant l'absence d'un ou de plusieurs analytes à détecter dans un échantillon, alors que ledit ou lesdits analytes étaient présents dans l'échantillon et auraient du être détectés.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins deux contrôles sélectionnés dans le groupe consistant en un contrôle du dépôt d'un échantillon, un contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte et un contrôle du dépôt d'un rapporteur, pour sécuriser une analyse multiplexe d'un échantillon.

La présente invention a particulièrement pour objet l'utilisation d'au moins un contrôle du dépôt d'un échantillon, au moins un contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte et au moins un contrôle du dépôt d'un rapporteur, pour sécuriser une analyse multiplexe d'un échantillon.

Ladite utilisation est de préférence réalisée sur un support solide comprenant au moins un compartiment tel que défini ci-dessus ou sur un ensemble de billes tel que défini ci-dessus.

5 Le contrôle du dépôt d'un échantillon, le contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte, le contrôle du dépôt d'un rapporteur et l'échantillon sont notamment tels que définis ci-dessus.

10 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront mieux au travers des exemples qui suivent, donnés à titre illustratif et non limitatif. Ces exemples et figures illustrent l'invention sans en limiter la portée.

Figures

15 Figure 1 : Exemple de support solide de type microplaque pour une analyse multiplexe sécurisée. En A est représenté un schéma de principe d'une microplaque comportant 18 puits. En B est représenté schématiquement le fond d'un puits de la microplaque. Chaque puits de la microplaque comprend 9 spots, dont 6 spots sont destinés chacun à la détection d'un ou plusieurs analyte(s) permettant de diagnostiquer une infection (respectivement A1, A2, A3, A4, A5 et A6) et 3 spots contrôles : SDC (*Contrôle du dépôt d'un échantillon*), PVC (*Contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte*) et RVC (*Contrôle du dépôt d'un Rapporteur*). En C sont représentés schématiquement les trois spots contrôles comprenant les anticorps de détection liés à la phase solide (PS). Ac CC : Anticorps de détection du composé contrôle. Ac Add : Anticorps de détection de l'additif. MS + B : Molécule support marquée à la biotine.

25 Figure 2 : Schéma d'un contrôle du dépôt d'un échantillon (SDC) positif en format hétérologue. Le contrôle du dépôt d'un échantillon comprend l'anticorps de capture du composé contrôle fixé à la phase solide (PS). L'anticorps de capture est ici spécifique du récepteur soluble de la transferrine (sTfR). Le composé contrôle, ici le complexe 2 : 2 récepteur soluble de la transferrine (sTfR) : transferrine (Tf) est fixé à l'anticorps de capture au niveau du contrôle du dépôt d'un échantillon et à l'anticorps de détection (Ac 2) qui est spécifique de la transferrine. L'anticorps de détection (Ac 2) est marqué avec la biotine (B). La révélation se fait par ajout de streptavidine couplée à de la peroxydase (S-POD), puis du substrat de cette enzyme (non représenté). L'anticorps de capture et l'anticorps de détection peuvent être des anticorps monoclonaux ou polyclonaux. Dans tous les cas, il s'agit d'un sandwich hétérologue.

35 Figure 3 : Schéma d'un contrôle du dépôt d'un échantillon (SDC) positif en format homologue. Le contrôle du dépôt d'un échantillon comprend l'anticorps de capture du

composé contrôle fixé à la phase solide (PS). L'anticorps de capture est ici spécifique du récepteur soluble de la transferrine (sTfR). Le composé contrôle, ici le complexe 2 : 2 récepteur soluble de la transferrine (sTfR) : transferrine (Tf) est fixé à l'anticorps de capture au niveau du contrôle du dépôt d'un échantillon et à l'anticorps de détection (Ac 2) qui est également spécifique du récepteur soluble de la transferrine (sTfR). L'anticorps de détection (Ac 2) est marqué avec la biotine (B). La révélation se fait par ajout de streptavidine couplée à de la peroxydase (S-POD), puis du substrat de cette enzyme (non représenté). L'anticorps de capture et l'anticorps de détection sont par exemple des anticorps monoclonaux. Il s'agit d'un sandwich homologue.

10 Figure 4 : Schéma d'un contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte (PVC) positif. Le contrôle de procédé comprend l'anticorps de capture de l'additif fixé à la phase solide (PS). L'anticorps de capture est ici spécifique de la digoxigénine (Dig). L'additif comprend de la digoxigénine et de la BSA, la digoxigénine étant complexée à la BSA. L'additif est lié via la digoxigénine à l'anticorps de capture au niveau du contrôle du
15 dépôt d'un ligand de détection d'un analyte et à l'anticorps de détection (Ac 2). L'anticorps de détection (Ac 2) est marqué avec la biotine (B). La révélation se fait par ajout de streptavidine couplée à de la peroxydase (S-POD), puis du substrat de cette enzyme (non représenté). L'anticorps de capture et l'anticorps de détection peuvent être tous les deux des anticorps monoclonaux ou tous les deux des anticorps polyclonaux, auquel cas il
20 s'agit d'un sandwich homologue. L'anticorps de capture peut être un anticorps monoclonal et l'anticorps de détection un anticorps polyclonal, ou inversement, auquel cas il s'agit d'un sandwich hétérologue.

Figure 5 : Schéma d'un contrôle du dépôt d'un rapporteur positif (RVC). Le contrôle du dépôt d'un rapporteur comprend une molécule support (MS) couplée à de la biotine (B) fixée à la phase solide (PS). La révélation se fait par ajout de streptavidine couplée à de la peroxydase (S-POD), puis du substrat de cette enzyme (non représenté).

Figure 6 : Grille de « spotting » située au fond d'un puits d'une microplaque et comportant les spots de 5 analytes à doser (A1 à A5) et les trois spots contrôle SDC, PVC et RVC.

30 Figure 7 : Distribution du signal des billes contrôle SDC en format simplex d'une population de 94 échantillons. En ordonnées est indiqué le nombre d'échantillons et en abscisse des intervalles d'unités Relatives d'Intensité de Fluorescence (RFI).

Figure 8 : Distribution du signal des billes contrôle PVC en format simplex d'une population de 38 échantillons. En ordonnées est indiqué le nombre d'échantillons et en
35 abscisse des intervalles d'unités Relatives d'Intensité de Fluorescence (RFI).

Exemples

Exemple 1 : Procédé « puce liquide »

Principe

- 5 Les deux contrôles décrits dans cet exemple permettent de valider (*cf. tableau 1*) :
- pour le SDC (« *Sample Deposit Control* » ou « contrôle du dépôt d'un échantillon ») : le dépôt de l'échantillon et également l'étape 2 (dépôt des conjugués 2, i.e. les ligands de détection déposés dans l'étape 2) et l'étape 3 (dépôt du rapporteur S-PE : streptavidine couplée à la Phycoérythrine) et
 - 10 - pour le PVC (« *Process Verification Control* » ou « contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte ») : le dépôt de l'étape 1 (dépôt des conjugués 1, i.e. les ligands de détection déposés à l'étape 1) et également l'étape 2 (dépôt des conjugués 2, en pointillé car non illustré dans cet exemple) et l'étape 3 (dépôt du rapporteur S-PE).

15

Tableau 1 : Etapes contrôlées par les contrôles SDC et PVC

	Echantillon	Conjugués 1 (étape 1)	Billes (étape 1)	Conjugués 2 (étape 2)	S-PE (étape 3)
SDC	X			X	X
PVC		X		X	X

Matériels

(i) Système d'analyse

- 20 L'analyseur BioPlex 200® (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) est utilisé selon les instructions du fabricant. Cet automate d'immunoanalyse contient un cytomètre en flux et un détecteur Luminex 100™ (Luminex Corp., Austin, Texas, Etats-Unis) et utilise des jeux hétérogènes de particules superparamagnétiques. Chaque groupe homogène de particules, composées de polystyrène et d'acide méthacrylique (fonction COOH), et d'une
- 25 taille de 8 µm de diamètre, est fabriqué avec différents pourcentages de fluorochromes (CL1 et CL2) produisant un code d'identification unique assigné à chaque groupe de particules et détectable par le laser du détecteur Luminex 100™ (Luminex Corp., Austin, Texas, Etats-Unis). Après la réaction immunologique, les billes d'un jeu passent une à une à travers une cellule à flux, au centre d'une gaine liquide, pour être simultanément
- 30 excitées et lues par deux lasers distincts. Les mesures sont réalisées au passage de chaque bille.

Le laser à rayon rouge de 638 nm excite les fluorochromes d'identification (CL1 et CL2) incrustés à la surface de chaque particule et le signal composite est interprété pour identifier l'analyte détecté par la particule. Ce laser sert donc, en identifiant la catégorie de particule, à identifier le test en cours.

5 Le laser à rayon vert de 532 nm excite le rapporteur S-PE (streptavidine couplée à la Phycoérythrine) et la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de rapporteur fixé sur la particule. Ce laser sert donc à mesurer la réactivité de l'analyte immobilisé sur ladite particule.

10 Le logiciel du système convertit le signal lié à la présence du ligand de détection en une valeur d'intensité relative de fluorescence (IRF en français ou RFI en anglais). Un ratio peut être calculé afin de classer le résultat qualitativement en positif ou négatif.

(ii) Phase solide (billes)

15 Un ensemble de billes comportant six groupes distincts de particules superparamagnétiques Luminex™ (Luminex Corp., Austin, Texas, Etats-Unis) est utilisé. Cet ensemble de billes comprend un groupe de billes pour contrôler le dépôt d'un échantillon (billes SDC), un groupe de billes pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte (billes PVC) et 4 groupes de billes de détection d'un analyte (analytes à doser : A1, A2, A3 et A4).

20 Chaque groupe de particules est revêtu d'un ligand de capture spécifique d'un test particulier. Chaque ligand de capture est couplé à l'aide d'un réactif hétéro-bifonctionnel.

Les billes SDC sont recouvertes d'un anticorps monoclonal de souris anti-récepteur soluble de la Transferrine (Fitzgerald, Etats-Unis) immobilisé à 1 µg/ mg de particules.

25 Les billes PVC sont recouvertes d'un anticorps polyclonal de mouton anti-Digoxigénine (Abcam, Etats-Unis) immobilisé à 5 µg/mg de particules.

Les billes de détection des analytes A1, A2, A3 et A4 sont recouvertes avec un ou des ligands de captures spécifiques des analytes à détecter.

30 (iii) Ligands de détection

Le ligand de détection du composé contrôle (du contrôle SDC), pAb-anti-Tf-biot, est un anticorps polyclonal de mouton anti-Transferrine (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) couplé à la biotine (Thermo Scientific, France) à l'aide d'un réactif hétéro-bifonctionnel en soi connu de l'homme du métier.

35 Le ligand de détection de l'additif (du contrôle PVC), pAb-anti-DIG-biot, est un anticorps polyclonal de mouton anti-Digoxigénine (Abcam, France) couplé à la biotine

(Pierce, Etats-Unis) à l'aide d'un réactif hétéro-bifonctionnel en soi connu de l'homme du métier.

(iv) Additif

5 L'additif BSA-DIG est de la Digoxigénine (Sigma, France) greffée sur une molécule support, dans cet exemple l'Albumine de Sérum Bovin (Millipore, France) à l'aide d'un réactif hétéro-bifonctionnel en soi connu de l'homme du métier.

(v) Rapporteur

10 Le rapporteur S-PE est de la streptavidine (Roche, Allemagne) couplée à la Phycoérythrine (Cyanotech, Hawaii, Etats-Unis) à l'aide d'un réactif hétéro-bifonctionnel en soi connu de l'homme du métier.

(vi) Diluants

15 vi.1. Diluant des particules superparamagnétiques

Solution de tampon Tris 50 mM, pH 7,5 contenant : NaCl 150 mM, EDTA 20 mM, Albumine de Sérum Bovin à 10%, IgG de souris (Meridian, Etats-Unis) à 500 µg/mL, Octyl-n-Glucoside à 0,10%, NaN₃ à 0,095%.

20 vi.2. Diluant des conjugués 1

Solution de Tampon Tris 50 mM, pH 7,5 contenant : NaCl 150 mM ; EDTA 20 mM, Chaps 0,1%, Glycérol 10%, NaN₃ à 0,095%.

vi.3. Diluant des conjugués 2

25 Solution de tampon citrate 50 mM, pH 6,7 contenant : NaCl 150 mM, EDTA 5,6 mM, Albumine de Sérum Bovin à 1%, Triton à 2%, Sérum de mouton à 10%, IgG de souris (Meridian, Etats-Unis) à 500 µg/mL, Proclin 300TM (marque de la société Supelco) à 0,5%, lait de vache (100% écrémé) à 15%, Glycérol 10%, NaN₃ à 0,095%.

30 vi.4. Diluant du rapporteur S-PE

Tampon phosphate, pH 7,4 contenant : NaCl 150 mM, Tween 20TM (marque de la société Sigma) à 0,1%, Proclin 300TM (marque de la société Supelco) à 0,5%, PEG 6000 2,75%, Albumine de Sérum Bovin 1%, Sérum Normal de mouton 1%, NaN₃ à 0,095%.

vi.5. Solution de lavage

Solution de tampon Tris 10 mM, pH 7,4 contenant : NaCl 218 mM, Tween 20TM (marque de la société Sigma) à 0,1%, Proclin 300TM (marque de la société Supelco) à 0,002%.

(vii) Cuvettes réactionnelles

Les réactions immunologiques ont lieu dans les puits de microplaques 96 puits en polypropylène ayant un volume maximum de 355 µL par puits.

(viii) Echantillons

Les échantillons négatifs (sérum ou plasma) utilisés proviennent de l'établissement français du sang de Lille.

Méthodes

Le protocole d'essai en format multiplex comprend le dosage de 4 analytes différents, le dosage des analytes A1 et A2 étant réalisé en un temps immunologique, le dosage des analytes A3 et A4 étant réalisé en deux temps immunologiques.

Le format des essais est représenté dans les figures 2 et 4, dans lesquelles la S-PE est utilisé à la place de la S-POD.

Etape 1 :

1. Dans chaque puits d'une microplaque sont distribués successivement :

+ 100 µL d'échantillon

+ 25 µL de diluant des conjugués 1 contenant :

+/- BSA-DIG

+/- les ligands de détection des analytes A1 et A2

+ 25 µL de particules superparamagnétiques immunoréactives (mélange de particules, 1,2 µg par type de billes : SDC, PVC +/- billes des analytes à doser)

2. Le mélange est mis en incubation pendant 40 minutes à 37°C sous agitation.

3. Les étapes suivantes de lavage sont réalisées : séparation des phases solides et liquide par aimantation et 3 lavages successifs avec au moins 300 µL de solution de lavage. Au dernier lavage les particules sont remises en suspension.

Etape 2 :

4. Dans chaque puits réactionnel sont distribués 90 µL de diluant des conjugués 2 contenant :

+/- le ligand de détection du composé contrôle pAb-anti-Tf-biot

5 +/- le ligand de détection de l'additif pAb-anti-DIG-biot

+/- les ligands de détection des analytes A3 et A4

5. Le mélange est mis en incubation pendant 15 minutes à 37°C sous agitation.

6. Les étapes de lavage (idem point 3) sont réalisées.

10

Etape 3 :

7. 90 µL du rapporteur S-PE sont distribués dans chaque puits réactionnels.

8. Le mélange est mis en incubation pendant 15 minutes à 37°C sous agitation.

9. Les étapes de lavage (idem point 3) sont réalisées.

15

10. Les particules sont remises en suspension dans chaque puits réactionnel en ajoutant 120 µL de solution de lavage puis la microplaque est agitée.

11. La suspension de particules de chaque puits est aspirée par le cytomètre en flux.

20

12. La suspension de particules de chaque puits est lue à l'aide des deux rayons lasers.

13. Les résultats des lectures sont directement traités par le cytomètre en flux et enregistrés en unités Relatives d'Intensité de Fluorescence (unités RFI).

14. Pour l'interprétation des résultats, pour chaque échantillon un ratio est calculé par rapport à une valeur-seuil (« cut-off »).

25

Calcul du ratio

Le ratio SDC des échantillons est calculé de la façon suivante :

$$\text{Ratio SDC échantillon} = \frac{\text{Signal RFI de l'échantillon}}{\text{Valeur seuil SDC}}$$

30

De même, le ratio PVC des échantillons est calculé comme il suit :

$$\text{Ratio PVC échantillon} = \frac{\text{Signal RFI de l'échantillon}}{\text{Valeur seuil PVC}}$$

Les échantillons dont les ratios (SDC ou PVC) sont supérieurs à 1 sont déclarés «valides », ceux pour lesquels les ratios sont inférieurs à 1 sont déclarés « invalides ».

La valeur seuil SDC et PVC a été établie suivant une étude statistique décrite dans les résultats ci-dessous.

5 Résultats

(i) Système SDC en format simplex

Dans ce système, les billes de détection des analytes A1 à A4 et leurs ligands de détection ne sont pas utilisés.

10 L'étude de 94 échantillons permet de définir la valeur seuil du système SDC (*cf. figure 7*). La valeur seuil du système SDC est calculée en soustrayant 3 fois l'écart type du signal de la population d'échantillons à la valeur moyenne du signal de la population.

Tableau 2 : Statistiques du signal SDC de la population de 94 échantillons et calcul de la valeur seuil

Moyenne (RFI)	334
Ecart-type (σ) (RFI)	44,02
Coefficient de variation (CV) en %	13,2%
Maximum de la population (RFI)	427
Minimum de la population (RFI)	239
Valeur seuil = Moyenne - 3 σ (RFI)	201,5

15

La réponse du système SDC est mesurée dans le cas d'un procédé nominal (Volume échantillon déposé = 100 μ L, Volume Conjugués 2 = 90 μ L, Volume S-PE = 90 μ L) (cas n°1 du tableau 3). Les cas 2, 3, 4 du tableau 3 sont des procédés dégradés : cas 2 = absence de dépôt échantillon, cas 3 = absence de dépôt des conjugués 2, cas 4 = absence de dépôt S-PE.

20

Dans ce cas, le mélange comprenant les « conjugués 2 » comprend 90 μ L de diluant des conjugués 2 contenant le ligand de détection du composé contrôle pAb-anti-Tf-biot.

Tableau 3 : Récapitulatif des ratios SDC obtenus lors d'un procédé nominal (cas 1) et de procédés dégradés (cas 2, 3 et 4)

Cas	Volume Echantillon (µL)	Volume Conjugués 2 (µL)	Volume S-PE (µL)	RFIs*	Ratio SDC	Statut VALIDE / NON VALIDE
1	100	90	90	331	1,6	VALIDE
2	0	90	90	31	0,2	NON VALIDE
3	100	0	90	29	0,1	NON VALIDE
4	100	90	0	29	0,1	NON VALIDE

*RFIs : Intensités Relatives de Fluorescence

5 Les cas 2, 3, 4 conduisent à des ratios SDC inférieurs à 1 ce qui permet d'invalider les mesures issues de ces procédés dégradés.

(ii) Impact du système SDC sur les performances en format multiplex

10 Dans le système SDC en format multiplex (MPX), les billes de détection des analytes A1 à A4 et les ligands de détection correspondants sont utilisés.

15 En comparant les signaux RFI obtenus entre un format MPX sans SDC versus MPX avec SDC (cf. *tableau 4*), l'ajout d'un format SDC n'impacte pas les performances d'un multiplex comportant 4 analytes (i.e. les écarts en % entre les signaux RFI d'un format MPX sans SDC versus MPX avec SDC sont compris dans un intervalle +/- 20% ce qui est considéré comme statistiquement acceptable).

Tableau 4 : Comparaison en % des signaux RFI obtenus entre un format MPX sans SDC versus un format MPX avec SDC

	Nombre d'échantillons utilisés pour les calculs	Analyte 1	Analyte 2	Analyte 3	Analyte 4
Ecart moyen en % entre le signal RFI mesuré en MPX sans SDC versus MPX avec SDC	4 échantillons positifs Analyte 1	-5,2%			
	3 échantillons positifs Analyte 2		-3,0%		
	5 échantillons positifs Analyte 3			-2,2%	
	2 échantillons positifs Analyte 4				-19,9%
	32 échantillons négatifs pour les 4 Analytes	0,1%	1,3%	-0,1%	-2,5%

5

(iii) PVC en format simplex

Comme précédemment, dans ce format, les billes de détection des analytes A1 à A4 et les ligands de détection correspondant ne sont pas utilisés.

10 L'étude de 38 échantillons permet de définir la valeur seuil du système PVC (*cf. figure 8*).

La valeur seuil du système PVC est calculée en soustrayant 3 fois l'écart-type du signal de la population d'échantillons à la valeur moyenne du signal de la population (*cf. tableau 5*).

15 **Tableau 5** : Statistiques du signal PVC de la population de 38 échantillons et calcul de la valeur seuil.

Moyenne (RFI)	356
Ecart-type (σ) (RFI)	70,92
Coefficient de variation (CV) en %	19,9%
Maximum de la population (RFI)	510
Minimum de la population (RFI)	222
Valeur seuil = Moyenne - 3 σ (RFI)	143,4

La réponse du système PVC est mesurée dans le cas d'un procédé nominal (Volume échantillon déposé = 100 μL , Volume Conjugués 1 = 90 μL , Volume S-PE = 90 μL) (cas n°1 du tableau 6). Les cas 2, 3 du tableau 6 sont des procédés dégradés : cas 2 = absence de dépôt des conjugués 1, cas 3 = absence de dépôt S-PE.

5

Tableau 6 : Récapitulatif des ratios PVC obtenus lors d'un procédé nominal (cas 1) et de procédés dégradés (cas 2, 3)

Cas	Volume Conjugués 1 (μL)	Volume S-PE (μL)	RFIs*	Ratio	Statut VALIDE / NON VALIDE
1	90	90	356	2,5	VALIDE
2	0	90	93	0,6	NON VALIDE
3	90	0	30	0,2	NON VALIDE

Les cas 2 et 3 conduisent à des ratios PVC inférieurs à 1 ce qui permet d'invalider les mesures issues de ces procédés dégradés.

10

(iv) Impact du mode simplex versus multiplex sur les performances du système PVC

Dans le système PVC en format multiplex, les billes de détection des analytes A1 à A4 et les ligands de détection correspondants sont utilisés.

15

Les performances du système PVC sont similaires en mode simplex et en mode multiplex (cf. tableau 7).

20

Tableau 7 : Comparaison des performances PVC en mode simplex versus multiplex

	4 Analytes, PVC (multiplex)	PVC (simplex)
Moyenne RFI de 38 échantillons (RFI)	356	320
CV (%)	19,9%	20,6%
Max (RFI)	510	472
Min (RFI)	222	194
Valeur seuil = Moyenne - 3 σ (RFI)	143,4	121,7

Par ailleurs, en comparant les signaux RFI obtenus entre un format MPX sans SDC ni PVC versus un format MPX avec SDC et PVC, il s'avère que l'ajout des tests SDC et PVC n'impacte pas les performances d'un multiplex comportant 4 analytes à doser (i.e. les écarts en % entre les signaux RFI d'un format MPX sans SDC ni PVC versus un format MPX avec SDC et PVC sont compris dans un intervalle +/- 20%, ce qui est considéré comme statistiquement acceptable).

Exemple 2 : Procédé en spots ou « spotting »

10 **Matériels et Méthodes**

Les trois contrôles décrits dans cet exemple permettent de valider (*cf. tableau 8*) :

- pour le SDC (« Sample Deposit Control » ou « contrôle du dépôt d'un échantillon ») : le dépôt de l'échantillon et également l'étape 2 (dépôt des conjugués 2), l'étape 3 (dépôt du rapporteur S-POD) et l'étape 4 (dépôt du substrat Luminol),
- 15 - pour le PVC (« Process Verification Control » ou « contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte ») : les dépôts de l'étape 1 (dépôt de l'additif et dépôt des conjugués 1), l'étape 3 (dépôt du rapporteur S-POD) et l'étape 4 (dépôt du substrat Luminol), et
- pour le RVC (« Revelation Verification Control » ou « contrôle du dépôt d'un rapporteur ») : l'étape de révélation, en contrôlant à la fois l'étape 3 (dépôt du rapporteur S-POD) et l'étape 4 (dépôt du substrat Luminol).

Tableau 8 : Etapes contrôlées par les contrôles SDC, PVC et RVC

	Echantillon	Additif (étape 1)	Conjugués 1 (étape 1)	Conjugués 2 (étape 2)	S-POD (étape 3)	Luminol (étape 4)
SDC	X			X	X	X
PVC		X	X		X	X
RVC					X	X

25

Matériels

(i) Système d'analyse

La technologie employée pour ce système est une technologie multiplex innovante de nanospotting sur biochip (*cf. définition ci-dessous*), avec révélation par

chimiluminescence grâce à un rapporteur marqué par l'enzyme de la peroxydase de raifort et révélé par un substrat de type luminol.

Le terme « biochip » (ou encore « biopuce ») est une collection de sites d'essais miniaturisés (ou « micro-array ») disposés sur un support solide qui permet d'effectuer de nombreux tests simultanément afin d'obtenir une cadence plus élevée.

Au sein de chaque puits d'une microplaque (Greiner, Allemagne) sont déposés par rangées à l'aide d'un robot spotteur, des gouttes de 50 nL d'une solution de protéines ou d'anticorps spécifiques de l'analyte à doser (A1, A2, A3, A4, A5, SDC, RVC et PVC) (*cf. figure 6*). Le fond de chaque puits de ces microplaques possède des capacités d'adsorption de protéines et peptides en soi connu de l'homme du métier. Les spots ainsi obtenus sont saturés avec une solution de saturation en soi connu de l'homme du métier.

Il est ensuite possible de réaliser une réaction immunologique classique en 1 temps ou 2 temps immunologiques au sein de ces biochips (ou biopuces).

Après la réaction immunologique, l'ajout du substrat de révélation entraîne une émission lumineuse. En effet, l'oxydation du luminol par catalyse enzymatique conduit à une émission lumineuse proportionnelle à la quantité de rapporteur Streptavidine-peroxydase fixé par le spot. L'acquisition du signal est réalisée par une caméra scientifique. L'image qui en résulte est alors analysée afin de déterminer l'intensité de la luminescence produite par chaque zone géographique du fond du puits correspondant à chaque spot (adressage de l'information).

Le logiciel du système convertit le signal mesuré par spot en une valeur d'Unités Relatives de Luminescence (« URL » en français ou « RLU » en anglais). Un ratio peut être calculé afin de classer le résultat qualitativement en positif ou négatif, comme détaillé ci-après.

(ii) Phase solide (spots)

Les différents spots de contrôle sont :

- le spot SDC comprenant un anticorps monoclonal de souris anti-récepteur soluble de la Transferrine (Fitzgerald, Etats-Unis) immobilisé à 50 µg/mL,
- le spot PVC comprenant un anticorps monoclonal de souris anti-Digoxigénine (Covalab, France) immobilisé à 25 µg/mL, et
- le spot RVC comprenant un anticorps monoclonal de souris anti-KLH (« Keyhole Limpet Hemocyanin ») (Genway, Etats-Unis) couplé à la biotine (Thermo Scientific,

France) à l'aide d'un réactif hétéro-bifonctionnel en soi connu de l'homme du métier et immobilisé à 1 µg/mL.

(iii) Ligands de détection

5 Le ligand de détection du composé contrôle (relatif au contrôle SDC), pAb-anti-Tf-biot, est un anticorps polyclonal de mouton anti-Transferrine (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) couplé à la biotine (Thermo Scientific, France) à l'aide d'un réactif hétéro-bifonctionnel en soi connu de l'homme du métier.

10 Le ligand de détection de l'additif (relatif au contrôle PVC), mAb-anti-DIG-biot, est un anticorps monoclonal de souris anti-digoxigénine couplé à la biotine (Covalab, France).

(iv) Additif

15 L'additif BSA-DIG est de la Digoxigénine (Sigma, France) greffée sur une molécule support, dans cet exemple l'Albumine de Sérum Bovin (Millipore, France). Le couplage est réalisé à l'aide d'un réactif hétéro-bifonctionnel en soi connu de l'homme du métier.

(v) Rapporteur

20 Le rapporteur S-POD est de la streptavidine (Roche, Allemagne) couplée à la Peroxydase (Roche Allemagne) par la méthode décrite par P. Nakane et A. Kawaoi (J Histochem Cytochem (1974) Vol. 22, No. 12. pp. 1084-1091), en soi connue de l'homme du métier.

(vi) Diluants

a) Diluant de l'additif

25 Solution de tampon Tris 50 mM, pH 7,5 contenant : NaCl 150 mM, EDTA 20 mM, IgG de souris (Meridian, Etats-Unis) à 500 µg/mL, Lait de vache (100% écrémé) à 15%, Sérum de mouton à 10%, NaN₃ à 0,095%.

b) Diluant des conjugués 1

30 Solution de Tampon Tris 50 mM, pH 7,5 contenant : NaCl 150 mM ; EDTA 20 mM, Chaps 0,1%, Glycérol 10%, NaN₃ à 0,095%

c) Diluant des conjugués 2

35 Solution de tampon citrate 50 mM, pH 6,7 contenant : NaCl 150 mM, EDTA 5,6 mM, Triton à 2%, Sérum de mouton à 10%, IgG de souris 500 µg/mL, Proclin 300™ (marque de la société Supelco) à 0,5%, lait de vache (100% écrémé) à 15%, Glycérol 10%. NaN₃ à 0,095%

d) Diluant du rapporteur S-POD

Solution de tampon citrate 50 mM, pH 6,7 contenant : NaCl 2053 mM, Tween 20TM (marque de la société Sigma) à 0,5%, Proclin 300TM (marque de la société Supelco) à 0,5%, lait de vache (100% écrémé) à 7%, Glycérol 20%.

e) Solution de lavage

Solution de tampon Tris 10 mM, pH 7,4 contenant : NaCl 218 mM, Tween 20TM (marque de la société Sigma) à 0,1%, Proclin 300TM (marque de la société Supelco) à 0,002%.

f) Substrat de révélation

Le substrat de révélation ELISTAR ETA C Ultra ELISA (Cyanagen, Italie) se compose de deux solutions : XLSE024L Luminol enhancer solution (A) et XLSE024P Peroxide solution (B).

(vii) Cuvettes réactionnelles

Les réactions immunologiques ont lieu dans des microplaques 96 puits en polystyrène ayant un volume maximum de 392 µL par puits.

(viii) Echantillons

Les échantillons négatifs (sérum ou plasma) utilisés proviennent de l'établissement français du sang de Lille.

Méthodes

Le protocole d'essai comprend les étapes suivantes.

Etape 1 :

1. Dans chaque puits d'une microplaque (comprenant les spots) sont distribués successivement :
 - + 20 µL de diluant de l'additif contenant l'additif BSA-DIG
 - + 20 µL de diluant des conjugués 1 comprenant :
 - + le ligand de détection de l'additif mAb-anti-DIG-biot et
 - + les ligands de détection des analytes à doser 1, 2 et 3
 - + 40 µL d'échantillon
2. Le mélange est mis en incubation pendant 40 minutes à 37°C sous agitation.
3. Trois lavages successifs avec au moins 400 µL de solution de lavage sont réalisés.

Etape 2 :

4. Dans chaque puits réactionnel sont distribués 50 µL de diluant des conjugués 2 contenant :

+ le ligand de détection du composé contrôle pAb-anti-Tf-biot et

5 + les ligands de détection des analytes à doser 4 et 5.

5. Le mélange est mis en incubation pendant 15 minutes à 37°C sous agitation.

6. Les étapes de lavage (idem point 3) sont réalisées.

Etape 3 :

10 7. 50 µL du rapporteur S-POD sont distribués dans chaque puits réactionnel.

8. Le mélange est mis en incubation pendant 15 minutes à 37°C sous agitation.

Etape 4 :

9. 25 µL de solution de révélation « B » sont distribués dans chaque puits réactionnels.

15 10. 25 µL de solution de révélation « A » sont distribués dans chaque puits réactionnels.

10. Le mélange est mis en incubation pendant 1 minute à 37°C sous agitation.

11. L'acquisition du signal de luminescence est réalisée pendant 180 secondes.

12. Les résultats des lectures sont directement traités par un système d'analyse d'image et enregistrés en Unités Relatives de Luminescence ou Relative light Unit (RLU).

20 13. Pour l'interprétation des résultats, pour chaque échantillon un ratio est calculé par rapport à une valeur-seuil (ou « cut-off »).

Calcul du ratioDeux modes d'analyses sont illustrés ci-dessous:

25

Mode d'analyse 1 : une seule valeur seuil

Le ratio SDC des échantillons est calculé de la façon suivante :

$$\text{Ratio SDC échantillon} = \frac{\text{Signal RLU de l'échantillon}}{\text{Valeur seuil SDC}}$$

30 De même, le ratio PVC des échantillons est calculé

$$\text{Ratio PVC échantillon} = \frac{\text{Signal RLU de l'échantillon}}{\text{Valeur seuil PVC}}$$

De manière similaire, le ratio RVC des échantillons est calculé

$$\text{Ratio RVC échantillon} = \frac{\text{Signal RLU de l'échantillon}}{\text{Valeur seuil RVC}}$$

5 Les échantillons dont les ratios (SDC ou PVC ou RVC) sont supérieurs à 1 sont déclarés « valides », ceux pour lesquels les ratios sont inférieurs à 1 sont déclarés « invalides ». La valeur seuil SDC, PVC et RVC a été établie suivant une étude statistique décrite au chapitre résultats ci-dessous.

10 Mode d'analyse 2: deux valeurs seuil

Deux ratios SDC des échantillons sont calculés de la façon suivante :

$$\text{Ratio SDC échantillon (seuil -)} = \frac{\text{Signal RLU de l'échantillon}}{\text{Valeur (seuil -)SDC}}$$

$$\text{Ratio SDC échantillon (seuil +)} = \frac{\text{Signal RLU de l'échantillon}}{\text{Valeur (seuil +)SDC}}$$

15 De même, les ratios PVC des échantillons sont calculés :

$$\text{Ratio PVC échantillon (seuil -)} = \frac{\text{Signal RLU de l'échantillon}}{\text{Valeur (seuil -)PVC}}$$

$$\text{Ratio PVC échantillon (seuil +)} = \frac{\text{Signal RLU de l'échantillon}}{\text{Valeur (seuil +)PVC}}$$

De manière similaire, les ratios RVC des échantillons sont calculés :

20
$$\text{Ratio RVC échantillon (seuil -)} = \frac{\text{Signal RLU de l'échantillon}}{\text{Valeur (seuil -)RVC}}$$

$$\text{Ratio RVC échantillon (seuil +)} = \frac{\text{Signal RLU de l'échantillon}}{\text{Valeur (seuil +)RVC}}$$

25 Les échantillons dont les ratios (seuil-) (SDC ou PVC ou RVC) sont supérieurs à 1 sont déclarés « valides », ceux pour lesquels les ratios sont inférieurs à 1 sont déclarés « invalides ».

Les échantillons dont les ratios (seuil+) (SDC ou PVC ou RVC) sont inférieurs à 1 sont déclarés « valides », ceux pour lesquels les ratios sont supérieurs à 1 sont déclarés « invalides ».

30 La valeur seuil SDC, PVC et RVC a été établie suivant une étude statistique décrite au chapitre résultats ci-dessous.

Résultats

Le multiplex décrit dans cet exemple comporte 5 analytes à doser 3 analytes dont les ligands de détection sont ajoutés en étape 1 (A1, A2 et A3), 2 analytes dont les ligands de détection sont ajoutés en étape 2 (A4 et A5) et les trois contrôles SDC, PVC et RVC.

Le tableau 9 regroupe les cas de figure pouvant être rencontrés lors d'une invalidation isolée ou cumulée des contrôles SDC, PVC et RVC.

Les réponses des contrôles SDC, PVC et RVC sont mesurées dans le cas d'un procédé nominal (Volume additif = 20 μL , Volume Conjugués 1 = 20 μL , Volume échantillon déposé = 40 μL , Volume Conjugués 2 = 50 μL , Volume S-POD = 50 μL , Volume Luminol = 25 μL solution B + 25 μL solution A) pour 22 échantillons.

L'étude de ces 22 échantillons permet de caractériser la réponse SDC, PVC, RVC en termes de réponse moyenne, déviation standard, valeur minimale et maximale (*cf. tableaux 10a et 10b*). Les valeurs seuils des contrôles SDC, PVC et RVC sont également calculées.

Tableau 9 : Interprétation de l'ensemble des contrôles SDC, PVC et RVC et identification de l'étape déficiente dans le procédé.

Statut SDC	Statut PVC	Statut RVC	Statut SDC et PVC et RVC	Etape déficiente à l'origine de l'invalidation du procédé
VALIDE / NON VALIDE	VALIDE / NON VALIDE	VALIDE / NON VALIDE	VALIDE / NON VALIDE	
NON VALIDE	VALIDE	VALIDE	NON VALIDE	Dépôt échantillon ou dépôt des ligands de détection à l'étape 2
VALIDE	NON VALIDE	VALIDE	NON VALIDE	Dépôt de l'additif ou dépôt des ligands de détection à l'étape 1
NON VALIDE	NON VALIDE	VALIDE	NON VALIDE	Dépôt échantillon ou dépôt des ligands de détection à l'étape 2 <u>et</u> Dépôt de l'additif ou dépôt des ligands de détection à l'étape 1
NON VALIDE	NON VALIDE	NON VALIDE	NON VALIDE	Dépôt S-POD ou Luminol De plus, dans ce cas de figure, les dépôts échantillons, additif, ligands de détection de l'étape 1, ligands de détection de l'étape 2 ne peuvent être validés ou invalidés.
VALIDE	VALIDE	NON VALIDE	Cas ne pouvant se présenter	Un signal RVC non valide implique une invalidation du SDC et PVC
NON VALIDE	VALIDE	NON VALIDE		
VALIDE	NON VALIDE	NON VALIDE		

Mode d'analyse 1 : une seule valeur seuil

Tableau 10a : Réponse des contrôles SDC, PVC et RVC (réponse moyenne, déviation standard, valeur minimale et maximale, valeurs seuils).

	SDC	PVC	RVC
Réponse moyenne (RLUs)	998	2623	3200
Ecart-type (σ) (RLUs)	124	154	214
Coefficient de variation (CV) en %	12,4%	5,9%	6,7%
Maximum de la population (RLUs)	1246	2997	3535
Minimum de la population (RLUs)	798	2407	2773
Valeur seuil = Moyenne - 3 σ (RLUs)	627	2162	2559

5

Mode d'analyse 2 : deux valeurs seuil

Tableau 10b : Réponses des contrôles SDC, PVC et RVC (réponse moyenne, déviation standard, valeur minimale et maximale, valeurs seuils).

	SDC	PVC	RVC
Réponse moyenne (RLUs)	998	2623	3200
Ecart-type (σ) (RLUs)	124	154	214
Coefficient de variation (CV) en %	12,4%	5,9%	6,7%
Maximum de la population (RLUs)	1246	2997	3535
Minimum de la population (RLUs)	798	2407	2773
Valeur (seuil-) = Moyenne - 3 σ (RLUs)	627	2162	2559
Valeur (seuil+) = Moyenne + 3 σ (RLUs)	1368	3084	3841

10

En combinant les réponses des contrôles SDC, PVC, RVC et les valeurs seuils calculées (cf. *tableau 10a et 10b*), les ratios SDC, PVC et RVC sont calculés pour chaque échantillon (cf. *tableau 11a et 11b*).

15

Mode d'analyse 1 : une seule valeur seuil

Tableau 11a : Réponses des contrôles SDC, PVC et RVC en RLU et ratios d'une population de 22 échantillons.

Ech N°	SDC			PVC			RVC			Statut SDC ET PVC ET RVC VALIDE / NON VALIDE
	RLUs SDC	Ratio SDC	Statut SDC VALIDE / NON VALIDE	RLUs PVC	Ratio PVC	Statut PVC VALIDE / NON VALIDE	RLUs RVC	Ratio RVC	Statut RVC VALIDE / NON VALIDE	
1	974	1,55	VALIDE	2997	1,39	VALIDE	3368	1,32	VALIDE	VALIDE
2	970	1,55	VALIDE	2407	1,11	VALIDE	3437	1,34	VALIDE	VALIDE
3	863	1,38	VALIDE	2489	1,15	VALIDE	2773	1,08	VALIDE	VALIDE
4	1072	1,71	VALIDE	2724	1,26	VALIDE	3216	1,26	VALIDE	VALIDE
5	1246	1,99	VALIDE	2830	1,31	VALIDE	3340	1,31	VALIDE	VALIDE
6	1219	1,94	VALIDE	2617	1,21	VALIDE	3165	1,24	VALIDE	VALIDE
7	1002	1,60	VALIDE	2743	1,27	VALIDE	3535	1,38	VALIDE	VALIDE
8	1172	1,87	VALIDE	2670	1,24	VALIDE	3150	1,23	VALIDE	VALIDE
9	835	1,33	VALIDE	2686	1,24	VALIDE	3082	1,20	VALIDE	VALIDE
10	932	1,49	VALIDE	2575	1,19	VALIDE	2806	1,10	VALIDE	VALIDE
11	1061	1,69	VALIDE	2641	1,22	VALIDE	3274	1,28	VALIDE	VALIDE
12	929	1,48	VALIDE	2617	1,21	VALIDE	3200	1,25	VALIDE	VALIDE
13	1098	1,75	VALIDE	2495	1,15	VALIDE	3445	1,35	VALIDE	VALIDE
14	996	1,59	VALIDE	2551	1,18	VALIDE	3382	1,32	VALIDE	VALIDE
15	876	1,40	VALIDE	2732	1,26	VALIDE	3459	1,35	VALIDE	VALIDE
16	896	1,43	VALIDE	2623	1,21	VALIDE	3310	1,29	VALIDE	VALIDE
17	897	1,43	VALIDE	2429	1,12	VALIDE	3219	1,26	VALIDE	VALIDE
18	798	1,27	VALIDE	2611	1,21	VALIDE	2977	1,16	VALIDE	VALIDE
19	906	1,44	VALIDE	2440	1,13	VALIDE	2993	1,17	VALIDE	VALIDE
20	1007	1,61	VALIDE	2412	1,12	VALIDE	2894	1,13	VALIDE	VALIDE
21	1093	1,74	VALIDE	2868	1,33	VALIDE	3294	1,29	VALIDE	VALIDE
22	1108	1,77	VALIDE	2547	1,18	VALIDE	3083	1,20	VALIDE	VALIDE

Mode d'analyse 2 : deux valeurs seuil

Tableau 11b : Réponses des contrôles SDC, PVC et RVC en RLU et ratios (seuil+), ratios (seuil-) d'une population de 22 échantillons.

Ech N°	SDC			PVC			RVC		
	RLUs SDC	Ratio SDC (seuil -)	Ratio SDC (seuil +)	RLUs PVC	Ratio PVC (seuil -)	Ratio PVC (seuil +)	RLUs RVC	Ratio RVC (seuil -)	Ratio RVC (seuil +)
1	974	1,55	0,71	2997	1,39	0,97	3368	1,32	0,88
2	970	1,55	0,71	2407	1,11	0,78	3437	1,34	0,89
3	863	1,38	0,63	2489	1,15	0,81	2773	1,08	0,72
4	1072	1,71	0,78	2724	1,26	0,88	3216	1,26	0,84
5	1246	1,99	0,91	2830	1,31	0,92	3340	1,31	0,87
6	1219	1,94	0,89	2617	1,21	0,85	3165	1,24	0,82
7	1002	1,60	0,73	2743	1,27	0,89	3535	1,38	0,92
8	1172	1,87	0,86	2670	1,24	0,87	3150	1,23	0,82
9	835	1,33	0,61	2686	1,24	0,87	3082	1,20	0,80
10	932	1,49	0,68	2575	1,19	0,83	2806	1,10	0,73
11	1061	1,69	0,78	2641	1,22	0,86	3274	1,28	0,85
12	929	1,48	0,68	2617	1,21	0,85	3200	1,25	0,83
13	1098	1,75	0,80	2495	1,15	0,81	3445	1,35	0,90
14	996	1,59	0,73	2551	1,18	0,83	3382	1,32	0,88
15	876	1,40	0,64	2732	1,26	0,89	3459	1,35	0,90
16	896	1,43	0,65	2623	1,21	0,85	3310	1,29	0,86
17	897	1,43	0,66	2429	1,12	0,79	3219	1,26	0,84
18	798	1,27	0,58	2611	1,21	0,85	2977	1,16	0,78
19	906	1,44	0,66	2440	1,13	0,79	2993	1,17	0,78
20	1007	1,61	0,74	2412	1,12	0,78	2894	1,13	0,75
21	1093	1,74	0,80	2868	1,33	0,93	3294	1,29	0,86
22	1108	1,77	0,81	2547	1,18	0,83	3083	1,20	0,80

5

Le statut des interprétations à partir des ratios (seuil+) et (seuil-) des contrôles SDC ; PVC, RVC est « Valide » pour les 22 échantillons. Le statut des interprétations des contrôles SDC et PVC et RVC est « Valide » pour l'ensemble des 22 échantillons.

10

Une étude de cas de procédés réalisés en mode dégradé est illustrée dans les tableaux 12 et 13a et 13b. Six cas sont présentés :

- Cas 1 = absence de dépôt d'échantillon.
- Cas 2 = absence de dépôt d'additif.
- Cas 3 = absence de dépôt de conjugués 1.
- Cas 4 = absence de dépôt de conjugués 2.
- 5 - Cas 5 = absence de dépôt de S-POD.
- Cas 6 = absence de dépôt de Luminol.

Mode d'analyse 1 : une seule valeur seuil

10 Les cas 1 et 4 conduisent à des ratios SDC inférieurs à 1 ce qui permet d'invalider les mesures issues de ces procédés dégradés.

Les cas 2 et 3 conduisent à des ratios PVC inférieurs à 1 ce qui permet d'invalider les mesures issues de ces procédés dégradés.

15 Les cas 5 et 6 conduisent à des ratios SDC, PVC et RVC inférieurs à 1 ce qui permet d'invalider les mesures issues de ces procédés dégradés. Le signal RVC permet d'invalider spécifiquement l'étape de révélation (dépôt S-POD et dépôt Luminol). Cependant, l'invalidation du procédé par un ratio RVC inférieur à 1 implique une absence du signal systématique des contrôles SDC et PVC (*cf. zone grise du tableau 9*). Il n'est, dans ce cas, pas possible de déterminer si les dépôts de l'échantillon et des conjugués 2 (dépôts contrôlés par SDC) ou les dépôts d'additif et des conjugués 1 (dépôts contrôlés par PVC) se sont déroulés correctement ou non.

20

Mode d'analyse 2 : deux valeurs seuil

25 Les cas 1 et 4 conduisent à des ratios (seuil-) SVC inférieurs à 1 ce qui permet d'invalider les mesures issues de ces procédés dégradés. De plus dans le cas 1, le ratio (seuil+) PVC est supérieur à 1 ce qui traduit un impact indirect de l'absence d'échantillon sur le contrôle PVC.

Les cas 2 et 3 conduisent à des ratios (seuil-) PVC inférieurs à 1 ce qui permet d'invalider les mesures issues de ces procédés dégradés.

30 Les cas 5 et 6 conduisent à des ratios (seuil-) SDC, PVC et RVC inférieurs à 1 ce qui permet d'invalider les mesures issues de ces procédés dégradés. Le signal RVC permet d'invalider spécifiquement l'étape de révélation (dépôt S-POD et dépôt Luminol). Cependant l'invalidation du procédé par un ratio (seuil-) RVC inférieur à 1 implique une absence du signal systématique des contrôles SDC et PVC (*cf. zone grise du tableau 9*). Il n'est, dans ce cas, pas possible de déterminer si les dépôts de l'échantillon et des conjugués 2 (dépôts contrôlés par SDC) ou les dépôts d'additif et des conjugués 1 (dépôts contrôlés par PVC) se sont déroulés correctement ou non.

35

Tableau 12 : Détail des 6 cas de procédé dégradé

Cas	Etape 1			Etape 2	Etape 3	Etape 4
	Volume Echantillon (µL)	Volume Additif (µL)	Volume Conjugués 1 (µL)	Volume Conjugués 2 (µL)	Volume S-POD (µL)	Volume Luminol (µL)
1	0	20	20	50	50	50
2	40	0	20	50	50	50
3	40	20	0	50	50	50
4	40	20	20	0	50	50
5	40	20	20	50	0	50
6	40	20	20	50	50	0

5

Mode d'analyse 1 : une seule valeur seuil

Tableau 13a : Réponse des contrôles SDC, PVC et RVC en RLU et ratio d'une population de 22 échantillons

Cas	SDC			PVC			RVC			SDC ET PVC ET RVC VALIDE / NON VALIDE (NV)
	RLUs SDC	Ratio SDC	SDC VALIDE / NON VALIDE (NV)	RLUs PVC	Ratio PVC	PVC VALIDE / NON VALIDE (NV)	RLUs RVC	Ratio RVC	RVC VALIDE / NON VALIDE (NV)	
1	37	0,06	NV	3939	1,82	VALIDE	3458	1,35	VALIDE	NV
2	991	1,58	VALIDE	72	0,03	NV	3569	1,39	VALIDE	NV
3	983	1,57	VALIDE	59	0,03	NV	3046	1,19	VALIDE	NV
4	18	0,03	NV	2727	1,26	VALIDE	3655	1,43	VALIDE	NV
5	5	0,01	NV	4	0,00	NV	5	0,00	NV	NV
6	6	0,01	NV	7	0,00	NV	5	0,00	NV	NV

Mode d'analyse 2 : deux valeurs seuil

Tableau 13b : Réponse des contrôles SDC, PVC et RVC en RLU et ratio d'une population de 22 échantillons

Cas	SDC				PVC				RVC				SDC ET PVC ET RVC
	RLUs SDC	Ratio SDC (seuil -)	Ratio SDC (seuil +)	SDC VALIDE / NON VALIDE (NV)	RLUs PVC	Ratio PVC (seuil -)	Ratio PVC (seuil +)	PVC VALIDE / NON VALIDE (NV)	RLUs RVC	Ratio RVC (seuil -)	Ratio RVC (seuil +)	RVC VALIDE / NON VALIDE (NV)	
1	37	0,06	0,03	NV	3939	1,82	1,28	<u>NV</u>	3458	1,35	0,90	VALIDE	NV (mesure directe), NV (mesure indirecte de l'effet de l'absence d'échantillon sur PVC)
2	991	1,58	0,72	VALIDE	72	0,03	0,02	NV	3569	1,39	0,93	VALIDE	NV
3	983	1,57	0,72	VALIDE	59	0,03	0,02	NV	3046	1,19	0,79	VALIDE	NV
4	18	0,03	0,01	NV	2727	1,26	0,88	VALIDE	3655	1,43	0,95	VALIDE	NV
5	5	0,01	0,00	NV	4	0,00	0,00	NV	5	0,00	0,00	NV	NV
6	6	0,01	0,00	NV	7	0,00	0,00	NV	5	0,00	0,00	NV	NV

Par ailleurs, en comparant les signaux RLU obtenus entre un format MPX sans SDC ni PVC versus un format MPX avec SDC et PVC, il s'avère que l'ajout des tests SDC et PVC n'impacte pas les performances d'un multiplex comportant 4 analytes à doser (i.e. les écarts en % entre les signaux RLU d'un format MPX sans SDC ni PVC versus un format MPX avec SDC et PVC sont compris dans un intervalle +/- 20% ce qui est considéré comme statistiquement acceptable).

62
REVENDEICATIONS

- 5 1. Support solide approprié pour une analyse multiplexe d'au moins un échantillon, ledit support solide comprenant au moins un compartiment, ledit compartiment comprenant au moins un spot contrôle et au moins deux spots de détection d'un analyte, caractérisé en ce que ledit spot contrôle est un spot pour contrôler le dépôt d'un échantillon ou un spot pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte et en ce que ledit spot pour contrôler le dépôt d'un échantillon ou pour
10 contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte comprend au moins un ligand de capture sectionné dans le groupe consistant en un anticorps, un antigène, un peptide, un glucide et un lipide.
- 15 2. Support solide selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit compartiment comprend au moins un spot pour contrôler le dépôt d'un rapporteur.
- 20 3. Support solide selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit compartiment comprend au moins un spot pour contrôler le dépôt d'un échantillon et au moins un spot pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte.
- 25 4. Support solide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le spot pour contrôler le dépôt d'un échantillon comprend au moins un ligand de capture d'un composé contrôle.
- 30 5. Support solide selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le spot pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte comprend au moins un ligand de capture d'un additif.
- 35 6. Support solide selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que le spot pour contrôler le dépôt d'un rapporteur comprend un marqueur indirect ou une molécule support couplée à un marqueur indirect.
7. Ensemble de billes approprié pour une analyse multiplexe d'un échantillon, comprenant au moins une bille contrôle et au moins deux billes de détection d'un analyte, caractérisé en ce que la bille contrôle est une bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon ou une bille pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un

analyte et en ce que ladite bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon ou pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte comprend au moins un ligand de capture sectionné dans le groupe consistant en un anticorps, un antigène, un peptide, un glucide et un lipide.

5

- 8.** Ensemble de billes selon la revendication 7, comprenant au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un échantillon, au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un ligand de détection d'un analyte et éventuellement au moins une bille pour contrôler le dépôt d'un rapporteur.

10

- 9.** Procédé d'analyse multiplexe pour la détection d'au moins n analytes dans au moins un échantillon, n étant un nombre entier supérieur ou égal à 2, ledit procédé comprenant au moins les étapes a), c) et e) ou au moins les étapes a), b), c) et d) suivantes :

15

- a) fournir (i) au moins un support solide selon l'une des revendications 1 à 6 ou (ii) au moins un ensemble de billes selon la revendication 7 ou 8,

- b) mettre en présence des spots dudit compartiment ou en présence dudit ensemble de billes : l ligands de détection de p analytes à détecter et, le cas échéant, au moins un additif, l étant de préférence supérieur ou égal à p,

20

- c) mettre un échantillon à analyser en présence des spots dudit compartiment ou dudit ensemble de billes,

- d) mettre en présence des spots dudit compartiment ou dudit ensemble de billes : l' ligands de détection de m analytes à détecter et, le cas échéant, au moins un ligand de détection dudit ou desdits additifs, l' étant de préférence supérieur ou égal à m, et

25

- e) mettre en présence des spots dudit compartiment ou dudit ensemble de billes : au moins un ligand de détection d'un composé contrôle et l'' ligands de détection de y analytes à détecter, l'' étant de préférence supérieur ou égal à y,

30

- l, l', l'', m, p et y étant des nombres entiers supérieurs ou égaux à 0 et la somme $m+p+y$ étant supérieure ou égale à 1.

- 10.** Procédé d'analyse multiplexe selon la revendication 9, comprenant une étape ultérieure f) consistant à mettre au moins un rapporteur en présence des spots dudit compartiment ou dudit ensemble de billes.

35

11. Procédé d'analyse multiplexe selon la revendication 10, caractérisé en ce que le rapporteur ou au moins un des rapporteurs de l'étape f) est couplé à un marqueur indirect, par exemple une enzyme, et en ce que ledit procédé comprend une étape ultérieure g) consistant à mettre au moins un deuxième rapporteur dudit marqueur indirect couplé au rapporteur de l'étape f) en présence des spots dudit compartiment ou dudit ensemble de billes, ledit deuxième rapporteur étant par exemple un substrat, de préférence choisi parmi le luminol, l'isoluminol ou un de leurs dérivés.
- 5
12. Utilisation d'au moins un contrôle du dépôt d'un échantillon et/ou d'au moins un contrôle du dépôt d'un ligand de détection d'un analyte pour sécuriser un procédé d'analyse multiplexe d'un échantillon, caractérisée en ce qu'elle est réalisée sur un support solide selon l'une des revendications 1 à 6 ou sur un ensemble de billes selon la revendication 7 ou 8.
- 10
13. Utilisation selon la revendication 12, comprenant en outre l'utilisation d'au moins un contrôle du dépôt d'un rapporteur.
- 15

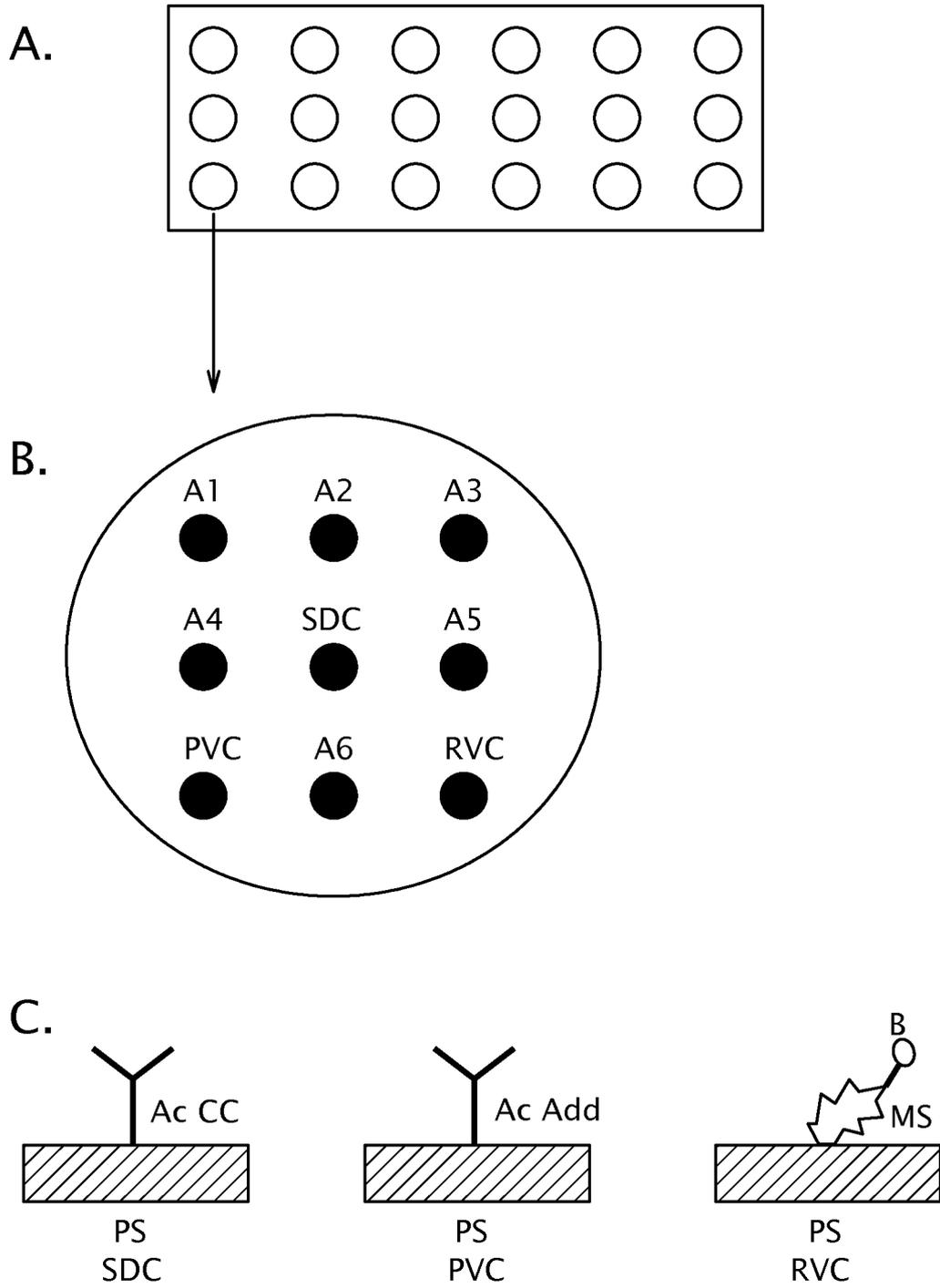


FIG.1

2/5

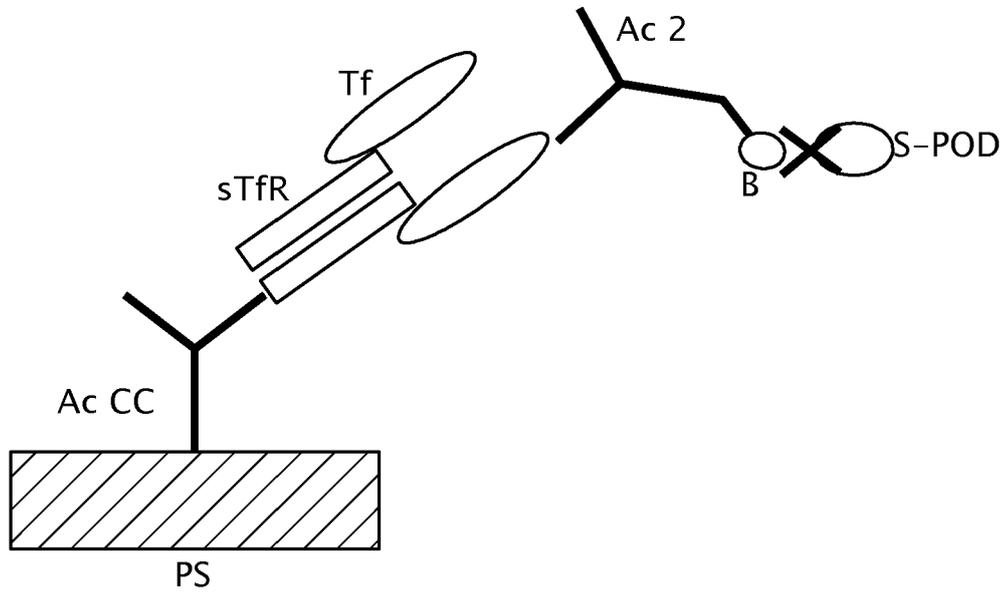


FIG. 2

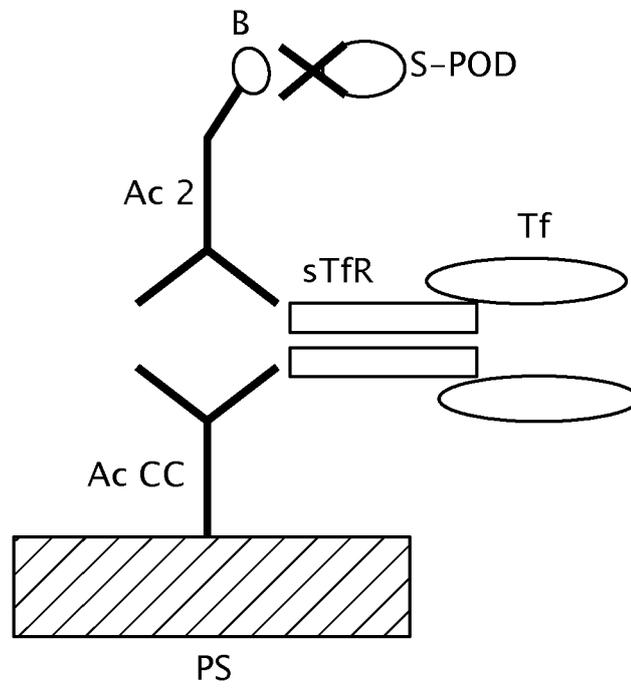


FIG. 3

3/5

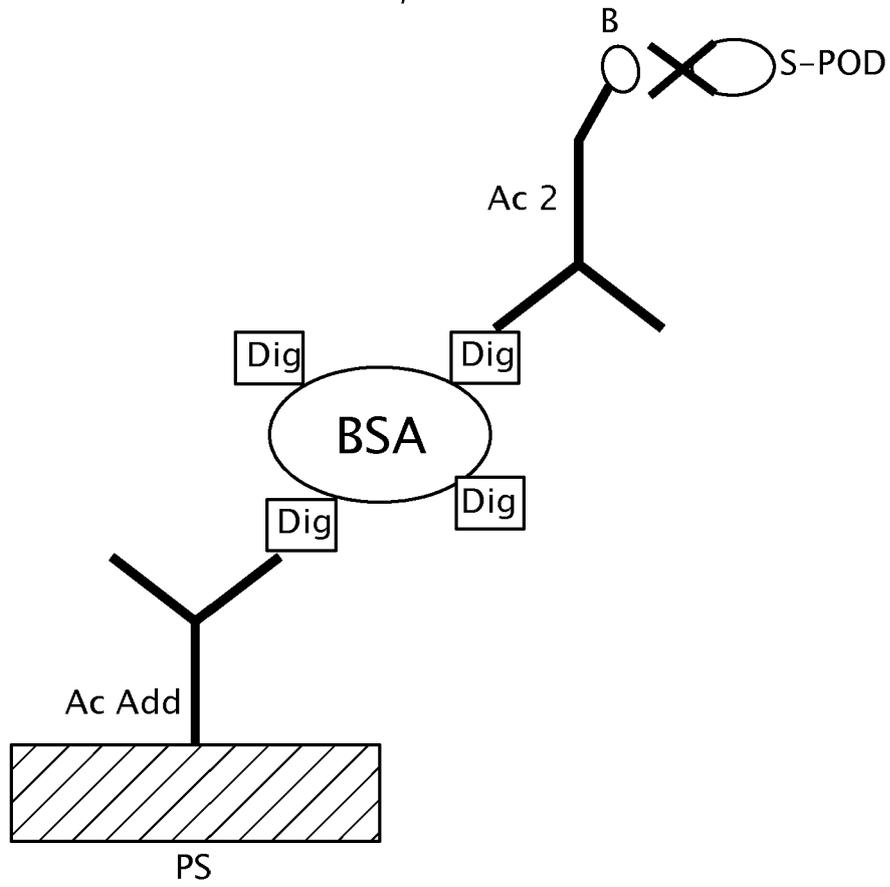


FIG.4

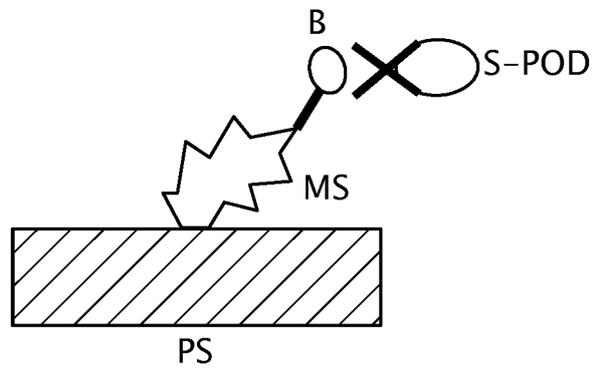


FIG.5

4/5

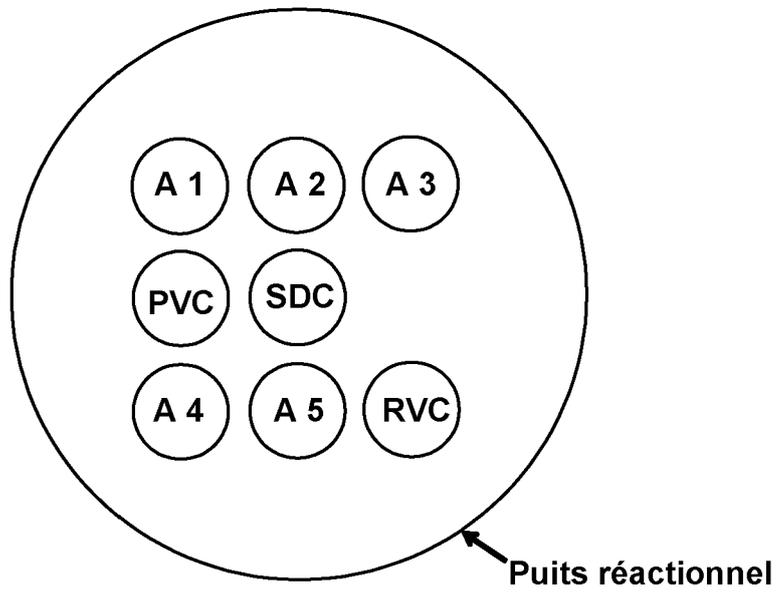


FIG.6

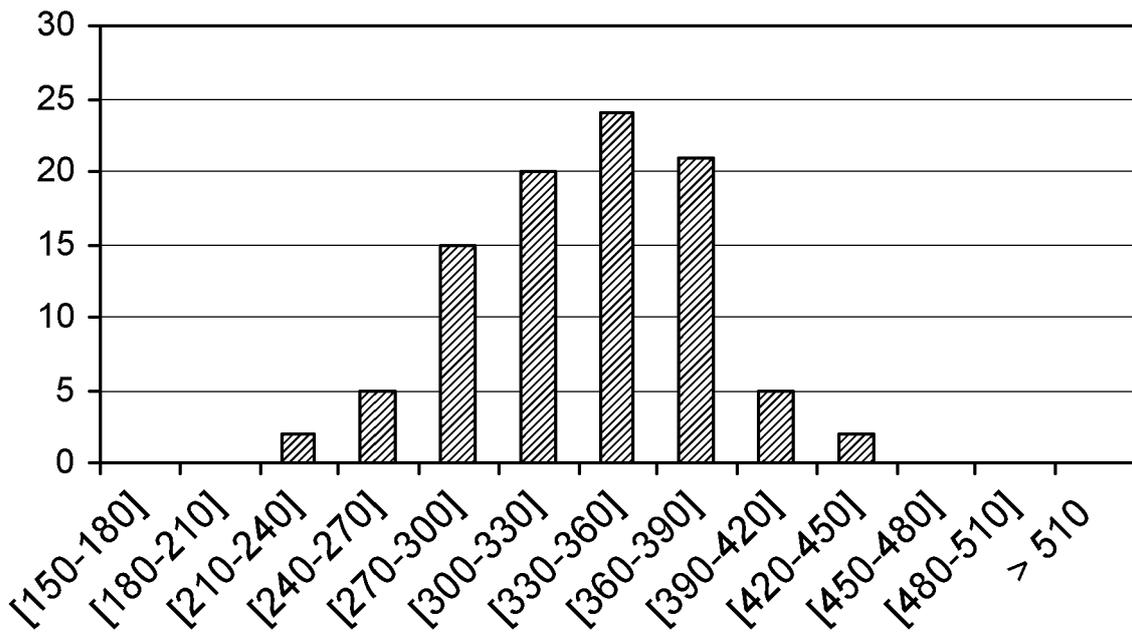


FIG.7

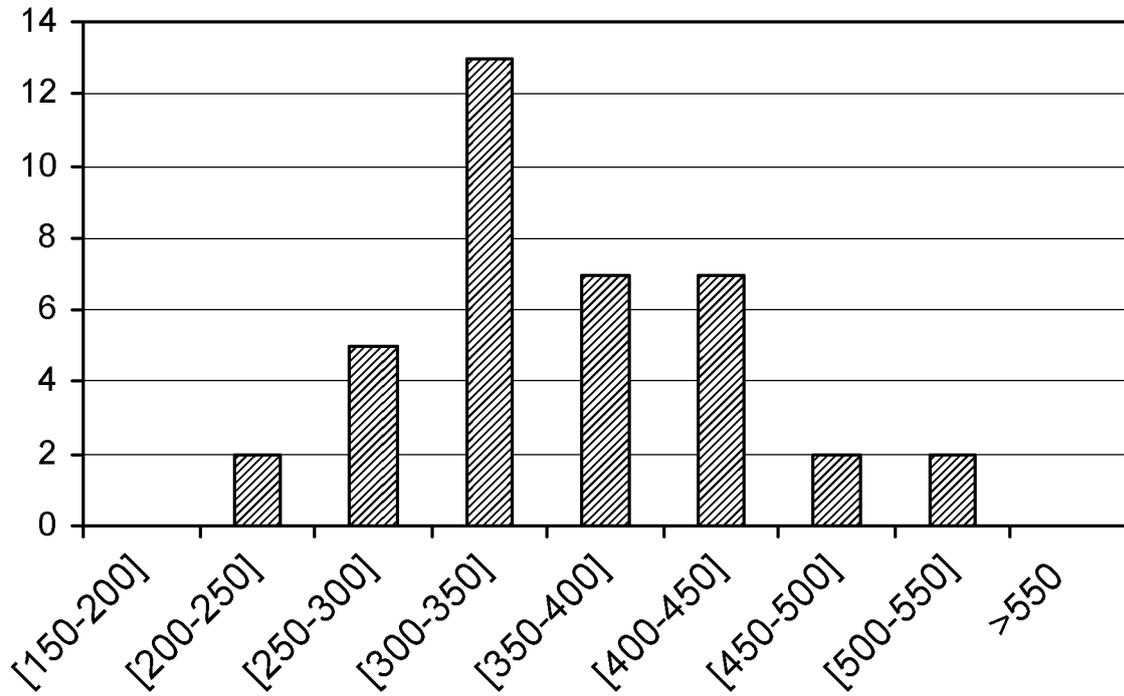


FIG.8

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

FERBAS J ET AL: "Feasibility of a multiplex flow cytometric bead immunoassay for detection of anti-epoetin alfa antibodies", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 14, no. 9, 1 septembre 2007 (2007-09-01), pages 1165-1172, XP009135119, ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CVI.00157-07 [extrait le 2007-07-18]

WILSON W J ET AL: "A multiplexed PCR-coupled liquid bead array for the simultaneous detection of four biothreat agents", MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 19, no. 2, 1 avril 2005 (2005-04-01), pages 137-144, XP004725276, ISSN: 0890-8508, DOI: 10.1016/J.MCP.2004.10.005

Sirs- Gmbh: "Lab-Arraytor human 60-inflammation", , 1 janvier 2006 (2006-01-01), XP055139202, Extrait de l'Internet: URL:www.sirs-lab.com [extrait le 2014-09-10]

WERLING D ET AL: "Ability to differentiate between cp and ncp BVDV by microarrays: Towards an application in clinical veterinary medicine?", VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 108, no. 1-2, 18 octobre 2005 (2005-10-18), pages 157-164, XP027672054, ISSN: 0165-2427 [extrait le 2005-10-18]

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

SCHUCHHARDT J ET AL: "NORMALIZATION STRATEGIES FOR CDNA MICROARRAYS", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 28, no. 10, 15 mai 2000 (2000-05-15), pages E47.I-E47.V, XP000982625, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/28.10.E47

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT