

Aspects technologiques et de développement des tests d'immunochromatographie

2.1 Les différentes étapes du développement

Le développement d'un kit de DMDIV est un processus long et complexe qui nécessite de nombreuses ressources. Un projet de commercialisation d'un test ICT doit prendre en compte toutes les contraintes liées au domaine des DM et des DMDIV. (Figure 11) L'organisation et le phasage du projet sont des éléments majeurs permettant de mener à bien un projet. (Figure 12)

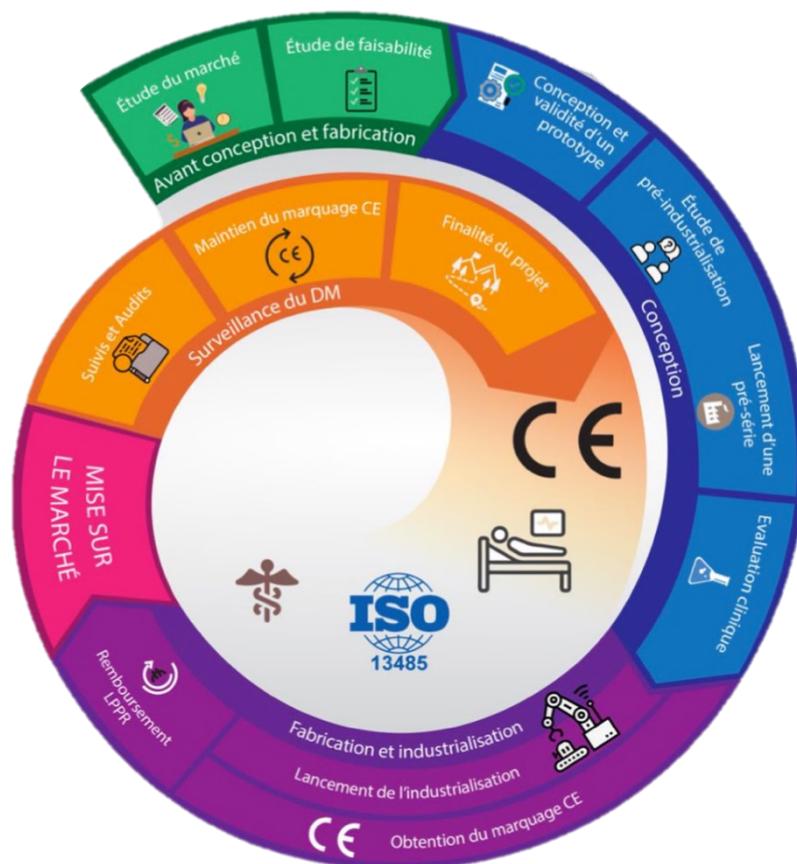


Figure 11 : Aperçu des différentes phases de mise sur le marché d'un DM

Source : *Guide d'accompagnement pour la mise sur le marché d'un Dispositif Médical (22)*

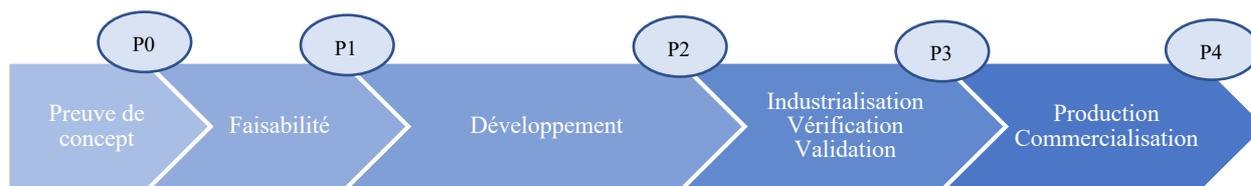


Figure 12 : Le phasage du projet de conception

Chaque phase fait l'objet de revues (réunions) par l'équipe projet au cours desquelles sont présentées des données techniques et de cadrage. Le changement de phase est autorisé par l'accord sur le jalon de phase (P). Des livrables techniques ou de cadrage sont édités en cours et en fin de chaque phase.

Dans le développement d'un test ICT, les étapes de preuve de concept et de faisabilité sont cruciales. Elles nous permettent de définir et pré-sélectionner certains éléments technologiques (notamment les matériaux) qui seront utilisés pour le développement du test. Ainsi, en fonction de la matrice de l'échantillon utilisé (sang, salive, urine, etc.), on pourra se servir de membranes spécifiques. Le but étant d'anticiper les commandes auprès des fournisseurs.

2.1.1 Preuve de concept (POC)

La preuve de concept (« proof of concept ») POC est une démonstration de la faisabilité d'un projet ou d'un produit. La preuve de concept est utilisée très en amont dans le processus de gestion de projet, il participe au cadrage. Elle doit éviter d'investir inutilement du temps et des moyens dans un projet au cas où il ne serait pas viable. Le but de la POC étant de démontrer la faisabilité du projet, il consiste à répondre à la question « Est-ce que cela peut être fait ? ». Avec les 2 volets suivants :

« Est-ce que la solution retenue est la bonne ? / Est-on capable de la mettre en œuvre ? ». La réponse est oui ou non, « Go » ou « No Go ».

Bien que la POC nécessite des ressources financières, elle peut s'avérer être une phase essentielle pour l'entreprise dans la mise en œuvre d'un projet complexe. Dans un premier temps, la POC permet de tester une solution en situation réelle et de mesurer sa faisabilité technique ou opérationnelle. Dans d'autres cas, elle peut également être bénéfique en cas de doute sur le prestataire et la solution choisie. Ainsi, elle peut permettre, dans ce cas, d'analyser plusieurs solutions pour choisir celle qui correspond le plus aux attentes. Cette phase clé permet de réduire les risques et les incertitudes, prendre des décisions éclairées et assurer un

développement en phase avec attentes et objectifs du projet. Elle valide ainsi le bien-fondé du projet.

La POC nous permet donc de confirmer la viabilité du projet. Avec l'étape de faisabilité, on va commencer à estimer les besoins réels du projet.

2.1.2 Faisabilité

Cette étape a pour objet d'essayer de répondre au besoin exprimé en explorant les différentes voies possibles de développement. Il est alors possible d'affiner le besoin, et de faire apparaître les fonctions assurées par le produit, permettant de satisfaire le besoin exprimé.

L'étude de faisabilité a pour but de :

- Mesurer les objectifs à atteindre, le budget d'étude, le prix de revient, la qualité attendue,
- Évaluer les conditions nécessaires à la réussite du projet (timing, matériel, compétences, performances attendues, financement, etc.),
- Étudier les différents scénarios possibles,
- Planifier la mise en production.

Cela revient à se demander si le projet sera rentable, s'il est techniquement réalisable ou encore si l'entreprise dispose des ressources humaines, financières, techniques pour le mettre en œuvre. Cette étude de faisabilité permet également d'aller chercher des capitaux pour financer la mise en œuvre du projet.

2.1.3 Développement

Cette étape est l'aboutissement final de la définition du produit, avant l'industrialisation. Il faudra définir les spécifications du système et préparer le dossier de fabrication du prototype.

Au cours de cette étape, il faudra concevoir un prototype fonctionnel : modèle original qui présente les principales caractéristiques techniques et fonctionnelles du futur produit final ; mais également définir exactement la solution retenue, les composants et les réactifs à fabriquer ce qui aboutira à la rédaction du dossier de définition. On travaillera sur un lot de

développement qui nous permettra de définir les performances attendues et notamment la LOD, la LOB, la répétabilité, la reproductibilité, la sensibilité et la spécificité (définie en partie **1.1.3**).

Rappel définitions

LOD : la limite de détection est définie comme la concentration la plus faible d'un analyte dans un échantillon qui peut être détecté de manière cohérente avec une probabilité donnée.

LOB : la limite de blanc est définie comme la concentration d'analyte observable la plus élevée que l'on s'attend à trouver lorsque l'on teste de nombreux échantillons ne contenant aucun analyte.

Répétabilité : Étroitesse entre les résultats successifs obtenus avec un même test sur un même échantillon dans des conditions identiques (protocole, opérateur, équipements etc.)

Reproductibilité : Étroitesse entre les résultats obtenus avec un même test sur un même échantillon avec de différents opérateurs ou un même opérateur utilisant des équipements différents.

A la fin du développement, l'étape d'industrialisation est préparée avec un plan de qualification du matériel de production, un lot ou des lots de développement utilisant l'outil industriel (outil de production à grande échelle) et une étude du changement d'échelle.

2.1.4 Vérification et Validation

A ce stade du projet on rentre dans la phase d'industrialisation. Dans cette étape il y a la fabrication des lots pilotes (en principe 3 lots) dans l'outil industriel avec une montée en échelle. L'objectif est de démontrer que les procédés de fabrication permettront de délivrer un produit conforme de façon fiable et reproductible. La question à se poser est :

Les produits développés sont-ils conformes :

- aux spécifications techniques et fonctionnelles ?
- à l'usage prévu et aux revendications annoncées ?

En parallèle, on doit s'assurer que toute la documentation technique est prête pour être évaluée par l'organisme notifié et pour les enregistrements futurs auprès des autorités réglementaires des zones concernées.

On termine cette étape par la validation de la conception, à savoir, l'étude des performances (cliniques) du système développé dans l'usage prévu et sur le terrain, la comparaison de méthode à un test existant ou de référence et éventuellement le recueil des données pour des publications ou des congrès.

Nous venons de décrire les différentes phases du développement des tests d'ICT, nous allons à présent nous intéresser à l'aspect technologiques de ces tests.

2.2 Les différents formats de test ICT

Deux formats de test ICT peuvent être utilisés (Figure 13) : le format direct (ou sandwich) et le format indirect (ou compétitif).

2.2.1 Le format direct (ou sandwich)

Il est généralement utilisé pour détecter des analytes plus volumineux ayant au moins deux sites de liaison. Habituellement, un anticorps dirigé contre un site de liaison est conjugué à la particule de détection (nanoparticule d'or) et un anticorps dirigé contre un autre site de liaison est utilisé pour la ligne test. Si la particule d'intérêt est présente dans l'échantillon, celle-ci se lie à la fois au conjugué anticorps-nanoparticule d'or et à l'anticorps sur la ligne test, produisant un signal positif. Le format en sandwich donne une intensité de signal sur la ligne test directement proportionnelle à la quantité d'analyte présente dans l'échantillon. Indépendamment de la quantité d'analyte dans l'échantillon, un anticorps anti-espèce situé sur la ligne de contrôle se lie à la particule de détection (nanoparticule d'or), produisant ainsi un signal de ligne de contrôle puissant démontrant que le test fonctionne correctement et que l'échantillon a bien été introduit. (23)

Par exemple, les TDR du paludisme utilisent le format direct, ils détectent des antigènes spécifiques (des protéines : PfHRP2, PLDH, aldolase) produits par les plasmodium présents dans le sang des personnes infectées. Certains TDR détectent les infections monospécifiques (soit *P. falciparum* soit *P. vivax*), d'autres détectent des infections mixtes (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*), tandis que d'autres distinguent les infections par *P. falciparum* et non *P. falciparum*, ou des espèces spécifiques. (24) Parmi les TDR du paludisme, on peut

retrouver le Palutop[®] +4 Optima de chez Biosynex, ICT Malaria[®] Fumouze et NxTek[®] Eliminate Malaria *Pf* Abbott (Figure 16).

La plupart des autotests et des tests antigéniques commercialisés utilisent le format direct. (25)

2.2.2 Le format indirect (ou compétitif)

Le format indirect est utilisé pour détecter les cibles lorsque des paires d'anticorps ne sont pas disponibles ou si la cible est trop petite telle que des stéroïdes, des amines biogènes (histamine) (26) et des médicaments. Dans ce format, la ligne test contient la molécule recherchée, généralement un complexe protéine-analyte, et le pad de conjugaison contient déjà le conjugué de détection anticorps-particule de détection (nanoparticule d'or). Si la molécule cible est présente, elle se lie au niveau de ligne test, ce qui empêche la liaison des particules de détection avec la ligne test. Il n'y a pas de signal sur la ligne test. Si la molécule cible n'est pas présente, les particules de détection (conjugué) présentes sur le pad de conjugaison se lient à la ligne test, produisant un signal. Dans le format compétitif, l'intensité du signal est inversement proportionnelle à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon. Comme dans le format sandwich, la ligne de contrôle lie les particules de détection avec ou sans la présence de la molécule cible, ce qui garantit que le fonctionne correctement.

On retrouve peu de test ICT utilisant le format indirect. Ce format est principalement utilisé en recherche (26) ou dans le cadre de la surveillance des denrées alimentaires. Comme par exemple, le test Reveal[®] pour l'histamine du laboratoire Neogen. Il est destiné au dépistage visuel de l'histamine dans les espèces de poissons scombroïdes comme le thon et le mahi-mahi. (27) Neogen commercialise aussi d'autres tests ICT compétitifs pour la détection de l'Ochratoxine A (Reveal[®] Q+ Ochratoxine), des saxitoxines (Reveal[®] 2.0 pour toxines PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)), etc.

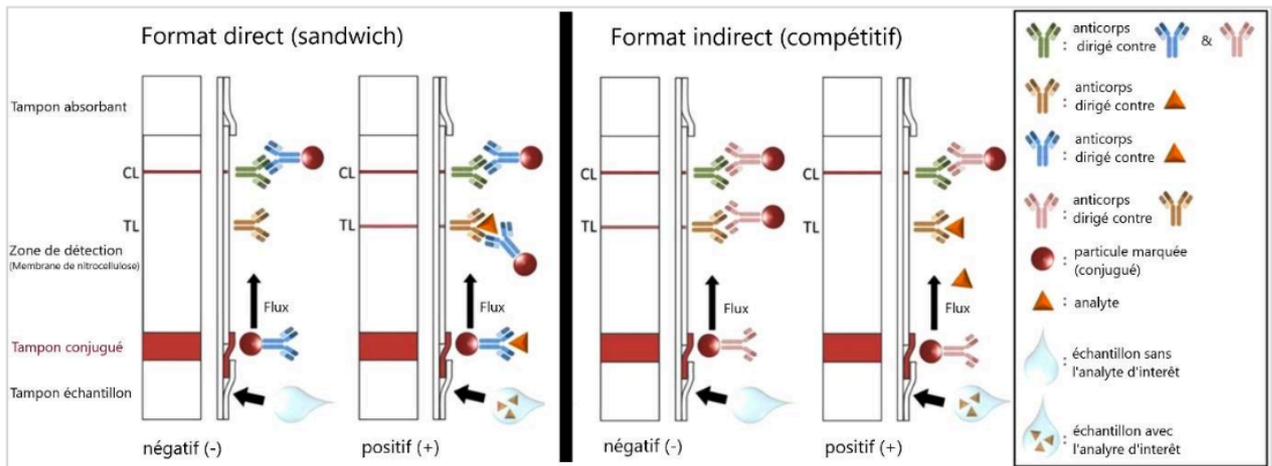


Figure 13 : Les deux formats de tests rapides immunochromatographiques à flux latéral

Source : Repris et adapté de Quesada-Gonzalez & Merkoçi (2015). (28)

2.3 Matériaux utilisés

Les différents éléments qui composent un kit de diagnostic utilisant un test ICT sont présentés dans la partie ci-dessous :

2.3.1 Tampon de lyse/migration

Le tampon de lyse/migration est un composant essentiel des tests ICT. C'est l'un des principaux réactif utilisé. Un tampon de lyse/migration bien formulé permet de tamponner le pH de l'échantillon, de minimiser les liaisons non spécifiques, de neutraliser les interférents et de contrôler la vitesse d'écoulement. Ceci est réalisé grâce à l'utilisation de divers sels, tensioactifs, détergents, agents stabilisants ou réactifs de blocage. (Exemple de composition : PBS 1X avec 1% de Tween®20). Ces composants et leurs concentrations sont propres à chaque système et ils doivent être optimisés tout au long du développement du test. Il est important de garder à l'esprit que plus le tampon de lyse/migration est simple, plus il sera facile à fabriquer et donc plus rentable pour la commercialisation du test. Par ailleurs, la durée de conservation du tampon est une notion importante pour la commercialisation du kit et en général au plus la composition du tampon est simple au plus la conservation sera longue. L'une des principales raisons pour lesquelles la composition du tampon doit être modifiée lors du développement est la non-spécificité du test. La liaison non-spécifique peut être surmontée en optimisant la composition du tampon de lyse/migration (ajout d'agents bloquants, tensioactifs, polymères, etc.) (29)

Le dépôt du tampon de lyse/migration sur la strip peut se faire de manière séquentielle ou simultanée :

Dans la manière séquentielle, l'échantillon est d'abord déposé sur un des spots de la cassette et c'est par la suite que le tampon de lyse/migration est déposé dans un autre spot. (Figure 16)

(30) En fonction de la configuration de la strip, l'échantillon déposé au niveau du pad échantillon sera donc « filtré » et le tampon de lyse/migration pourra ensuite être déposé au niveau du pad de conjugaison.

Dans la manière simultanée, l'échantillon et le tampon de lyse/migration sont soit déposés au même moment dans le même spot, soit ils sont mis en commun puis le mélange échantillon/tampon est déposé sur la zone de dépôt. Le temps de contact entre échantillon et tampon étant plus important dans la manière simultanée, le tampon peut ainsi lysé l'échantillon afin d'extraire l'analyte. Cette manière simultanée est utilisé lorsque l'échantillon doit être exposé aux composants du tampon de lyse/migration avant la migration sur la bandelette.

Dans certains cas, le tampon de lyse/migration est inclus (séché) dans le pad échantillon et ainsi lors du dépôt de l'échantillon, les éléments du tampon de lyse/migration rentrent en contact avec l'échantillon. (31)

2.3.2 Pad échantillon

Le pad échantillon est la porte d'entrée de l'échantillon dans le test. Le but du pad échantillon est de moduler toute la variabilité chimique (notamment le pH) entre l'échantillon et le système de détection, de répartir uniformément l'échantillon et de le diriger vers le pad de conjugaison. En effet, dans certaines matrices d'échantillons comme la salive ou encore l'urine, la composition peut varier et interférer avec le système de détection. Pour cela, il est généralement imprégné de sels tampons, de protéines, de tensioactifs et d'autres liquides pour contrôler le débit de l'échantillon et le rendre apte à l'interaction avec le reste de la bandelette. Si l'analyte d'intérêt est présent dans l'échantillon, il doit être capable de se lier aux réactifs de capture et à la membrane. De plus, les pores du pad échantillon peuvent agir en tant que filtre afin d'éliminer les matériaux superflus, par exemple les globules rouges. Le pad échantillon retient les particules indésirables tout en permettant au fluide contenant l'analyte de s'écouler à travers la bandelette.

Les principales caractéristiques à prendre en compte sont : (Tableau 4)

- l'épaisseur : une membrane plus épaisse a un volume de rétention plus grand et permet donc un volume d'échantillon plus grand.
- Le taux d'absorption : il correspond au taux d'écoulement latéral du liquide, il détermine la vitesse à laquelle l'échantillon se déplace à travers le pad échantillon et se transfère sur le pad de conjugaison. En définitive, cela contribue à la rapidité du test.
- Le matériau : fibre de cellulose, fibre de verre ou coton; la fibre de cellulose est plus efficace sur de grands volumes d'échantillon, a une résistance plus faible à l'écoulement ; la fibre de verre a globalement les caractéristiques inverses. Pour le coton, il a une vitesse d'écoulement plus faible que la fibre de verre et une rétention de l'échantillon plus importante.

Volume de l'échantillon	Nom du pad	Matériaux	Épaisseur (µm)	Taux d'absorption (s/4 cm)	Capacité d'absorption (mg/cm ²)
< 50 µL	CF1	Coton	176	207.3	18.7
> 50 µL	Standard 17	Fibre de verre	370	34.5	44.9
	VF2	Fibre de verre	785	23.8	86.2
	GF/DVA	Fibre de verre	785	28.3	93
50-150 µL	CF3	Coton	322	174.3	34.6
	CF4	Coton (+ traitement spécifique)	482	67.3	49.9
> 150 µL	Grade 470	Coton	840	77	78
	C083 (Merck Millipore)	Fibre de cellulose	830	/	/

Tableau 4 : Exemples de pads échantillons disponibles pour les tests ICT

Source : (32) (33)

2.3.3 Pad de conjugaison

A partir du pad échantillon, le liquide échantillon est ensuite transféré sur le pad de conjugaison (PCJ). Le rôle principal de ce dernier est de fixer les particules de détection (nanoparticules d'or liées à des anticorps par exemple) et de les maintenir fonctionnellement stables jusqu'à ce qu'elles soient remises en suspension par l'échantillon.

Les caractéristiques principales à considérer sont l'épaisseur et la densité. Ces 2 facteurs contribuent au volume dit « de rétention », essentiel pour l'absorption et la libération du conjugué. Lorsque le liquide se déplace à travers la membrane, les particules de détection doivent être libérées rapidement, et tout doit être mis en œuvre pour que la répartition des particules de détection dans le pad de conjugaison soit uniforme. (23) Cela est rendu possible par la composition du pad de conjugaison contenant des glucides (tels que le saccharose) qui sert de conservateur et d'agent de resolubilisation. (34) Lorsque les particules de conjuguées sont séchées en présence de sucre, les molécules de sucre forment une couche autour d'elles stabilisant leur structure biologique. Lorsque l'échantillon pénètre dans le pad de conjugaison, les molécules de sucres se dissolvent rapidement, entraînant les particules dans le flux de fluide. Il est essentiel que la libération soit cohérente entre les différentes membranes du test. Les matériaux utilisés sont la fibre de verre et la fibre de cellulose. La fibre de verre possède un bon volume de rétention et de faible liaison non spécifique, en revanche elle peut être difficile à manipuler lors de l'assemblage. La fibre de cellulose quant à elle permet une très faible liaison non spécifique et sa surface est très uniforme. Toutefois, la fibre de cellulose peut avoir un volume de rétention très faible lorsqu'elle est humide.

2.3.4 La membrane de nitrocellulose

La membrane est considérée comme l'élément le plus critique des tests ICT et la nitrocellulose est de loin le matériau le plus couramment utilisé. En effet, c'est à sa surface que se forment les complexes immunologiques et que le signal est détecté. Cette membrane est le matériau qui détermine le débit de migration de la cassette et donc le temps requis pour avoir un résultat. En effet, au moment du choix de la membrane de nitrocellulose, la caractéristique principale à prendre en compte est l'écoulement capillaire. (23) Il s'agit du temps nécessaire pour un liquide de migrer et remplir totalement une bande de membrane. Ce temps détermine le bon fonctionnement d'une bandelette et la sensibilité du système de détection. Il est inversement

proportionnel au débit capillaire, défini comme la distance parcourue par unité de temps. Le débit décroît de façon exponentielle à mesure que le front de migration remonte sur la membrane, rendant sa mesure difficile, car il change constamment. Ce débit capillaire est lié à la taille des pores de la membrane. A mesure que ceux-ci augmentent, le débit de la membrane augmente. Plus l'écoulement capillaire sera lent, plus le test sera sensible, mais plus le test prendra du temps. (Tableau 5) (Annexe 3)

Taille des pores de la membrane	Vitesse de migration (écoulement capillaire)	Sensibilité du test ICT
Grands	Rapide	Basse
Intermédiaires	Intermédiaire	Intermédiaire
Petits	Lent	Haute

Tableau 5 : Relation entre taille des pores des membranes, vitesse de migration et sensibilité dans un test ICT

Source : (23)

Un autre facteur important est l'épaisseur de la membrane. Cette épaisseur, déterminée par le volume des pores, agit sur le volume de liquide nécessaire pour saturer la membrane. Elle peut affecter la distribution des réactifs de capture sur la membrane, ou encore, quand la membrane est compressée (par exemple dans des tests de type cassette avec un boîtier en plastique), la variation peut entraîner un écrasement de la membrane et des pads.

La nitrocellulose étant hydrophobe, elle a une capacité d'adsorption élevée pour les protéines. Les membranes faites pour les tests ICT adsorbent généralement plus de 100 mg d'IgG/cm². Aux concentrations de réactifs de capture normalement appliquées, la capacité de liaison est 5 à 10 fois plus importante que nécessaire. Cette capacité d'adsorption diminue avec le poids moléculaire de la protéine. Un signal faible, souvent interprété comme une liaison protéique faible, est généralement dû à une interaction chimique qui interfère avec l'adsorption de la nitrocellulose ou qui favorise la désorption. Pour corriger cela, les anticorps et autres protéines doivent être appliqués sur la membrane dans des tampons avec sels, tensioactifs ou sucres. Des agents de blocage peuvent être utilisés pour améliorer les caractéristiques d'écoulement de la membrane, comme des surfactants, pour les rendre humides et uniformiser la membrane. En effet, les échantillons testés (urines, sang, salives, etc.) sont en général bien différents de l'eau que les fabricants utilisent pour leurs contrôles qualité. Ces échantillons s'écoulent bien souvent à des vitesses plus faibles. De plus, l'application des réactifs de capture (le plus souvent des anticorps formant les lignes test et contrôle) sur la membrane, crée des zones avec un

environnement chimique différent à cause des sels, tampons ou autres additifs utilisés pour la conception de ces réactifs de capture. L'échantillon ne peut plus traverser avec la même efficacité toute la membrane.

L'application des réactifs de captures (anticorps) sur la membrane se fait le plus souvent avec un automate de distribution par dépôt ou pulvérisation assistée (Figure 14). Cet appareil permet de répartir les réactifs avec ou sans contact (en les transformant en de minuscules gouttelettes) afin de les répartir uniformément en une bande sur la membrane. La méthode manuelle est possible, mais est beaucoup moins précise et donne des résultats souvent non reproductibles d'une bandelette à une autre. Les paramètres importants à prendre en compte sont la concentration des réactifs, la vitesse de distribution et le taux de distribution.

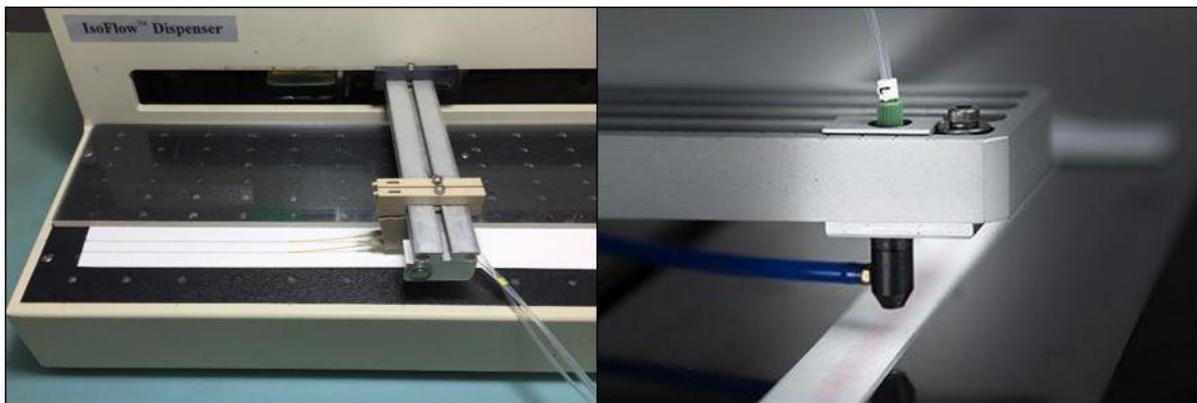


Figure 14 : Exemples d'automates permettant le dépôt de réactifs sur membrane

A gauche, l'automate IsoFlow® Dispenser (Imagene Technology) place les réactifs par dépôt direct. A droite, l'automate μ AirJet® (Biodot) les place par pulvérisation. Sources : (23) (31)

2.3.5 Pad absorbant

La fonction du pad absorbant est de faire passer l'échantillon à travers la membrane et de recueillir le liquide traité. Le volume de capture de toute membrane est donné et l'optimisation du pad absorbant à l'extrémité de la bandelette réactive permet d'augmenter le volume de l'échantillon pouvant être acheminé sur la membrane, car elle agit comme une éponge pour le volume supplémentaire. Ainsi ce matériau permet d'utiliser des volumes d'échantillons plus importants. La sélection optimale du pad absorbant minimisera le reflux de tout excès de réactif et fournira une lecture agréable du test. La présence du pad absorbant peut réduire les résultats non spécifiques et les problèmes de sensibilité. En effet, le volume supplémentaire qui traverse

la ligne de test élimine les complexes non spécifiques (qui sont faiblement liés à la ligne de test) et permet une augmentation de la concentration totale d'échantillon qui passe sur les bandes du test ICT. Cela permet ainsi d'augmenter la sensibilité du test et de réduire le bruit de fond du test. (23)

Les pads absorbants les plus populaires sont constitués de cellulose. Les caractéristiques à prendre en compte pour le choix du pad absorbant sont les mêmes que pour le pad échantillon : épaisseur, poids, résistance, matériau, taux d'absorption, capacité d'absorption, etc. En général, ils sont en fibres de cellulose, matériau qui a une grande capacité de rétention.

2.3.6 Élément de révélation

De nombreuses nanoparticules peuvent être utilisées pour la construction de tests ICT : colloïdes (or, carbone, argent), particules de latex, billes magnétiques, nanoparticules fluorescentes, quantum dots, liposomes chargés de colorants (35). Chaque composé offre des avantages et des inconvénients, mais les nanoparticules d'or (AuNPs) sont encore très largement préférées. La plupart du temps, dans les tests ICT, une liaison va être réalisée entre des anticorps et des AuNPs. L'or est un matériau inerte, facile à visualiser et à conjuguer. Les AuNPs sont accessibles, leurs propriétés sont connues depuis longtemps et elles sont assez simples à créer puisqu'elles peuvent être facilement réalisées en laboratoire. Elles ont aussi l'avantage d'être non toxiques, et compatibles avec un grand nombre d'applications (on les retrouve par exemple en microscopie électronique). (23)

Il existe 2 voies majeures de synthèse des AuNPs : la voie chimique et la voie physique. Pour la méthode chimique, il en existe beaucoup et elles se basent sur la réduction de la molécule d'or (Au). Il existe une synthèse par la réduction d'acide chloroaurique (HAuCl_4) en présence de citrate de sodium dans l'eau, appelée méthode de Turkevich (1951) et Frens (qui l'a amélioré en 1970) (36) (37). Le citrate de sodium va jouer le rôle de stabilisateur et d'agent réducteur. En variant la quantité de citrate, on fait varier la taille des nanoparticules obtenues, en général de l'ordre de 10 à 20 nm. En 1994, Brust et al. (38) ont développé une méthode permettant d'obtenir des nanoparticules stables de 1 à 5 nm de diamètre. HAuCl_4 va réagir avec le tétrahydroborate de sodium (NaBH_4) qui va le réduire. On ajoute ensuite des radicaux

thiols afin de stabiliser l'ensemble. (Figure 15) En effet, le complexe Au-S possède une grande force de liaison.

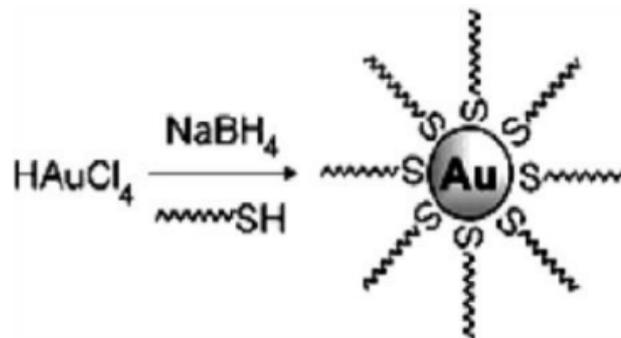


Figure 15 : Synthèse des nanoparticules d'or (AuNPs) par la méthode de Brust-Schiffrin

Source : (38)

Il existe aussi des méthodes de synthèse physiques ; cependant, elles mènent à des nanoparticules moins stables et donc moins intéressantes pour notre application. Ces méthodes consistent à fragmenter l'or massif via une ablation laser ou encore une irradiation ionique.

2.3.7 Les anticorps

Composants essentiels dans les tests ICT, les anticorps permettent la détection des antigènes potentiellement présents dans l'échantillon. Les anticorps sont des glycoprotéines sécrétées par des cellules dérivées des lymphocytes B, les plasmocytes. Ils sont aussi connus sous le nom d'immunoglobulines (Ig). Leur rôle est clé dans le système immunitaire puisqu'ils permettent notamment la neutralisation de certains agents pathogènes.

Les avantages et inconvénients des principaux anticorps utilisés sont listés dans le tableau 6 . La nature spécifique des anticorps a des conséquences sur la préparation du conjugué et son immobilisation sur la membrane. Actuellement, les anticorps monoclonaux ont tendance à être préférés. Du fait de leur nouveauté, il faudra quelques années avant de voir des tests ICT adaptés à partir de VHH (anticorps à domaine unique) ou d'aptamères de façon commerciale. Concernant les anticorps polyclonaux, les principaux inconvénients sont la variabilité d'un lot à l'autre lors de la production, les possibles interférences lors de la présence d'anticorps non-spécifique. (23)

	Monoclonal	Polyclonal	VHH	Aptamère
Avantages	Reproductibilité lot-à-lot	Moins cher à produire	Reproductibilité lot-à-lot	Reproductibilité lot-à-lot
	Approvisionnement illimité	Haute affinité	Approvisionnement illimité	Stabilité thermique
	Moins de bruit de fond que les polyclonaux	Peut reconnaître de multiples épitopes	Stabilité Spécificité Bas poids moléculaire	Synthèse chimique à faible coût
Inconvénients	Délai d'obtention	Variabilité lot-à-lot	Coût de développement	Nombre d'aptamères disponibles encore limités
	Coût plus élevé	Bruit de fond	Production complexe	Technologie récente
	Trop spécifique	Épitopes multiples = réactions croisées		Sensible aux nucléases

Tableau 6 : Comparaison des avantages et inconvénients des différents types d'anticorps

Source : (23)

2.3.8 Support et cassette

Les deux derniers éléments servent à soutenir les autres composants. Le support appelé aussi « backing card » est une partie plus rigide qui permet de soutenir les autres membranes et pads, et de les rassembler. Généralement fait en vinyle, il possède un côté adhésif permettant aux autres parties de venir se fixer dessus pour solidifier l'ensemble.

La cassette, quant à elle, est composée de plastique et permet de maintenir et protéger les composants en place. Elle permet une saisie « sécurisé » du dispositif, évitant ainsi la contamination des membranes. La cassette permet aussi de contrôler le débit en appliquant une pression en des points appropriés sur la bandelette afin de garantir que tout le fluide passe à travers la bandelette avec le même débit.

Il existe des cassettes qui contiennent 2 spots de dépôt, un pour le dépôt de l'échantillon (n°1) et un pour le dépôt du tampon de lyse/migration (n°2) (Figure 16).

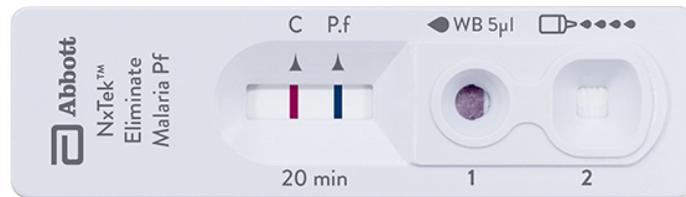


Figure 16 : Test ICT pour le diagnostic rapide du paludisme : NxTek® Eliminate Malaria Pf Abbott

En général, les cassettes de test ICT sont emballées dans des sachets individuels en aluminium avec dessiccant. Les sachets déshydratants (dessiccants), absorbeurs d'humidité servent à la protection contre l'humidité pendant le transport et le stockage. Ils sont communément à base de gel de silice ou d'argile déshydratée activée . (Figure 17)

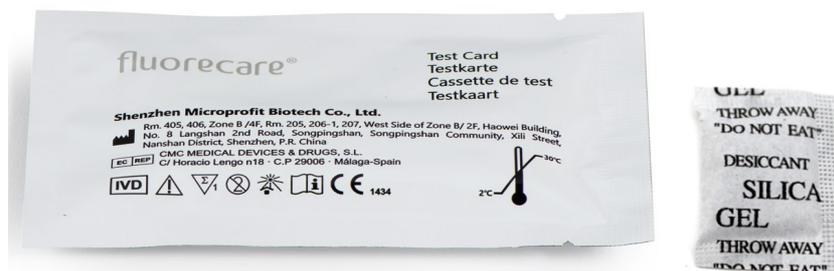


Figure 17 : Sachet aluminium contenant la cassette de test et sachet déshydratant (dessiccant)

2.3.9 Assemblage

Beaucoup de paramètres rentrent en compte pour faire un bon test ICT. La qualité, et le choix des membranes et des réactifs de marquage sont primordiaux. (Annexe 3) De plus, la taille de chaque composant, les différents traitements subis et la position des éléments (autant des membranes que des lignes tests et contrôles) peuvent faire varier les résultats. Tous ces paramètres rentrent en compte dans l'optimisation finale du test. Mais des aspects plus physiques rentrent aussi en considération comme la capillarité, le phénomène d'interaction qui se produit aux interfaces entre un liquide et une surface dans notre cas. Les tests ICT ont un flux qui progresse de manière continue, relativement stable et donc de façon laminaire.

Pour finir, un test peut paraître idéal au moment de la preuve de concept, mais ne pas donner les mêmes résultats dans le temps. Il faut alors revoir l'optimisation, parfois de chaque paramètre un par un, pour satisfaire le besoin initial.

2.4 Lecture des résultats

De nombreux moyens de lire les résultats existent. On distingue des lectures optiques, colorimétriques, fluorescentes, électrochimiques ou encore hybrides. (39) (Tableau 7)

Résultat		Quantitatif	Semi-quantitatif	Qualitatif
Élément de révélation				
Éléments de couleur (Nanoparticules d'or(AuNPs) et latex)	Lecteurs de bandes optiques ou caméra (avec logiciel de traitement d'image) pour mesurer l'intensité des couleurs produites sur la ligne de test et de contrôle		Inspection visuelle de la barre d'échelle, où le nombre de lignes colorées est une indication de la concentration en analyte	Contrôle visuel des couleurs de la ligne
Éléments de fluorescence (Quantum dots, ruthenium complexes)	Lecteur de bandelettes fluorescentes, enregistrant l'intensité de la fluorescence			
Autres éléments (paramagnétique, enzyme, nanoparticule de carbone, etc.)	Lecteurs de bandes magnétiques, détecteurs électrochimiques, lecteurs de chimioluminescence			

Tableau 7 : Les méthodes de détection les plus couramment utilisées dans les tests ICT

Dans le cas des nanoparticules d'or ou d'autres conjugués produisant des couleurs, une analyse qualitative ou semi-quantitative peut être effectuée par inspection visuelle des couleurs sur les lignes test et de contrôle. Le principal avantage de ce système est une lecture rapide avec une réponse de type oui/non. Des lecteurs analytiques peuvent être utilisés pour quantifier la réponse. L'image visuelle du test ICT peut être numérisée et analysée à l'aide d'instruments et de logiciels commerciaux.

Les colorants fluorescents ou les particules paramagnétiques ne peuvent pas être détectés directement à l'œil nu et nécessitent des lecteurs dédiés pour l'analyse qualitative ou quantitative. De plus, les méthodes de détection automatisées offrent des avantages par rapport à la lecture à l'œil nu en termes de consommation de temps, d'interprétation des résultats et d'ajustement des variables. Les lecteurs de téléphones portables sont devenus un instrument populaire pour développer des lecteurs applicables dans les pays en développement. (40) Parmi

les sociétés qui commercialisent des lecteurs de test ICT, on retrouve Lumos Diagnostics, Qiagen avec sa filiale Dialunox et Biosynex. (Figure 18)



Figure 18 : Lecteur de test ICT BSX Reader Biosynex

La liste des tests ICT utilisable sur ce lecteur est disponible en annexe 4.

2.5 Multiplexage

Jusqu'à présent les tests ICT ne permettaient de détecter qu'un seul pathogène donné. Avec l'apport du multiplexage, il est maintenant possible de détecter plusieurs pathogènes sur le même test. Le multiplexage est l'une des principale innovation technologique dans le domaine des tests ICT.

Parmi les différents tests ICT sur le marché, il existe des tests multiplex qui permettent d'identifier et de diagnostiquer différents pathogènes ou maladies. On peut retrouver notamment un test ICT permettant de détecter et de différencier les 5 familles de carbapénémases majeurs (KPC, Oxa-48 like, VIM, IMP,NDM). Le test est commercialisé par NG Biotech. (Figure 19) Les carbapénémases sont des enzymes que produisent les entérobactéries et qui inactivent les carbapénèmes, dernière génération des antibiotiques de la classe des β -lactamines. (41) Étant donné que les entérobactéries sont responsables d'une grande partie des infections nosocomiales et sont associées à une mortalité importante,

l'émergence et la dissémination de résistance aux carbapénèmes posent un problème de santé publique majeur.



Figure 19 : Le test ICT multiplex « CARBA-5 » de chez NG Biotech

Les tests ICT multiplex peuvent utiliser différentes conformations (structures), notamment l'utilisation de plusieurs bandelettes intégrées dans une seule et même cassette. (42)

Récemment, des tests ICT multiplex permettant de détecter le Sars-Cov2 et la grippe A/B (virus *Influenza* de type A et B) ont été commercialisés. On retrouve par exemple, le test antigénique MEDsan® Multiplex (SC2 et Flu A/B) à partir d'un prélèvement nasopharyngé ou oropharyngé (Figure 20) et le test AllTest® (Figure 21).

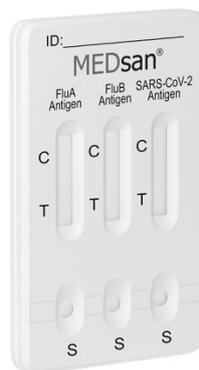


Figure 20 : Test antigénique MEDsan® Multiplex (SC2 et Flu A/B)

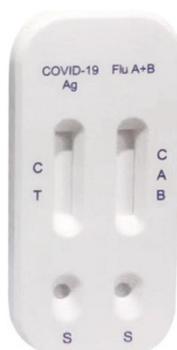


Figure 21 : Test antigénique AllTest® Covid-19 et Influenza A+B combo rapid test

Dans un autre domaine, les maladies d'origine alimentaire, qui sont principalement causées par des agents pathogènes d'origine alimentaire, constituent un grave danger pour la santé, tant dans les pays en développement que dans les pays développés. *Salmonella spp*, *Escherichia coli O157:H7*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae O1* et *V. cholerae O139* sont les agents pathogènes bactériens liés aux maladies d'origine alimentaire les plus fréquemment rencontrés. Les *Salmonella spp.* sont la principale cause bactérienne de maladie gastro-intestinale aiguë. Les sérotypes communs de *Salmonella* qui peuvent causer des maladies d'origine alimentaire comprennent *S. enteritidis*, *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C* et *S. choleraesuis*. Ces agents pathogènes peuvent exister (et généralement coexister) dans divers aliments, tels que les aliments crus ou insuffisamment cuits (viande, fruits de mer, volaille, etc.) et les produits prêts à consommer (légumes, fruits, produits laitiers, etc.), et une fois consommés par l'homme, ils peuvent provoquer de graves maladies infectieuses, avec des taux élevés d'hospitalisations et de décès. Le dépistage et la surveillance sur place des aliments et de l'eau à la recherche de divers agents pathogènes d'origine alimentaire sont essentiels pour garantir la sécurité alimentaire et minimiser l'apparition de maladies d'origine alimentaire. Ainsi, un disque contenant 10 canaux de détection contenant chacun un test ICT spécifique d'un pathogène a été développé. Le système est décrit dans la figure 22. La lecture du résultat se fait par un lecteur optique.

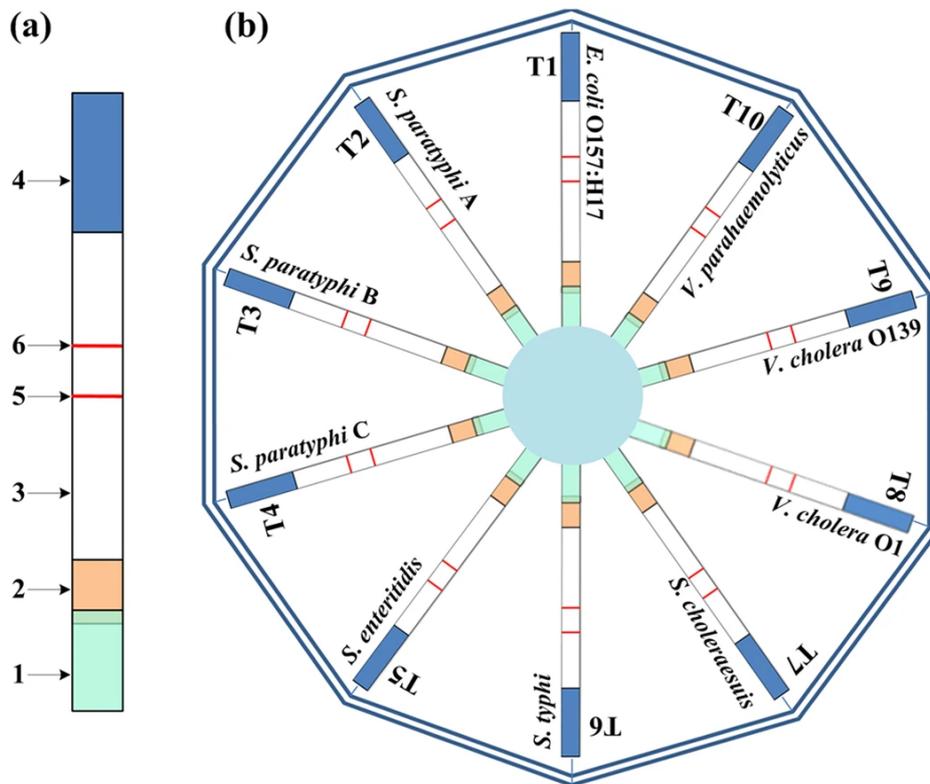


Figure 22 : Description schématique de la bande UPT-LF et du disque TC-UPT-LF

UPT-LF : Up-Converting Phosphor Technology based Lateral Flow

Source : (43)

- a) La bandelette est composée d'un pad échantillon (1), d'un pad de conjugaison (2), d'une membrane en nitrocellulose (3) et d'un pad absorbant (4). La membrane de nitrocellulose contient la ligne test (5) et la ligne contrôle (6).
- (b) Le disque TC-UPT-LF contient 10 canaux de détection (T1 à T10), qui contiennent les bandes UPT-LF appropriées pour les bactéries cibles.

Nous venons de voir les différents paramètres à prendre en compte pour le développement des tests d'ICT ainsi que les étapes clés de leur élaboration. Voyons maintenant en particulier le cas des tests de diagnostic de la Covid-19.