

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 80 15195**

---

(54) Compositions appropriées pour l'examen de tissus et/ou de liquides biologiques et son procédé d'utilisation.

(51) Classification internationale (Int. Cl.<sup>3</sup>). G 01 N 33/48, 21/75 // A 61 B 10/00.

(22) Date de dépôt..... 8 juillet 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Italie, 10 septembre 1979, n° 25568 A/79.*

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 13 du 27-3-1981.

---

(71) Déposant : Société dite : E.N.I. ENTE NAZIONALE IDROCARBURI, résidant en Italie.

(72) Invention de : Ivo Giannini et Vittorio Baroncelli.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Bureau D. A. Casalonga,  
8, av. Percier, 75008 Paris.

---

Compositions appropriées pour l'examen de tissus et/ou de liquides biologiques et son procédé d'utilisation."

---

5        La présente invention concerne une composition spéciale appropriée pour l'examen de tissus et/ou de liquides biologiques, c'est-à-dire pour y contrôler la présence de constituants particuliers. Elle concerne également le mode opératoire utilisant ladite composition.

10       Pour mieux comprendre le sujet et les objets de la présente invention, il est avantageux de considérer certains concepts généraux qui constituent le support théorique pour le sujet en question.

15       Quand une substance absorbe la lumière visible ou la lumière ultraviolette, on sait qu'un électron qu'elle contient passe de son stade de base à un stade activé "singulet".

20       Un croisement intersystème peut avoir lieu avec la création de stades métastables "triplets" dans lesquels l'électron reste emprisonné jusqu'à ce qu'il se produise une désactivation par une réaction de rupture de chaîne (par rencontre avec une autre molécule) ou par émission de lumière (phosphorescente) ou par d'autres procédés, tous étant relativement lents.

25       Ces phénomènes sont facilement remarqués dans diverses catégories de colorants naturels et synthétiques.

30       Un procédé largement utilisé pour étudier et déterminer quantitativement ce phénomène est le procédé dit "photolyse instantanée", procédé dans lequel l'échantillon contenant la substance à étudier est soumis à la radiation d'une source de lumière pulsée (éclair) qui fait passer un certain nombre de molécules colorées à l'état d'électrons activés.

35       Le développement du procédé mentionné ci-dessus est observé en décelant l'absorption d'un faisceau de lumière monochromatique continu par l'échantillon, cette absorption étant enregistrée en fonction du temps avec un dispositif électronique approprié (oscilloscope, etc.).

      Ce type de procédé s'est considérablement et qualitativement développé ces dernières années, en ce qui concerne une sensibilité plus élevée obtainable en utilisant les lasers

pulsés comme la source de perturbation.

Il est connu d'utiliser des procédés du type ci-dessus pour étudier et caractériser les tissus et/ou les liquides biologiques, à l'exception notable du cas dans lequel le tissu à examiner contient une grande quantité de substances naturelles photosensibles, comme dans le cas des pigments de la photosynthèse chlorophyllienne, la rhodopsine et la carboxy-hémoglobine.

Sous ce rapport, dans le cas d'un tissu qui est seulement légèrement coloré, l'éclair subira de préférence un processus de diffusion plutôt qu'une absorption. Cependant, le tissu peut être coloré avec des colorants synthétiques comme cela est fait couramment dans les procédés optiques d'observation au microscope. Sous ce rapport, le fait que le colorant teint un tissu signifie qu'il se lie à ce tissu d'une certaine façon.

Toutefois, on se heurte au moins à deux difficultés principales en utilisant les techniques de photolyse instantanée dans ce contexte pour les échantillons possédant un fort pouvoir de diffusion.

Premièrement, étant donné que les concentrations du colorant lié sont plutôt faibles, il n'est pas certain que l'on puisse obtenir des signaux significatifs en utilisant ce procédé. Deuxièmement, on ne peut pas prévoir à l'avance si les signaux dus aux absorptions caractérisant des états métastables du colorant seront différents, dans le cas d'un colorant lié à un tissu particulier, de ceux dus aux molécules en solution ou liées différemment.

Les auteurs de la présente invention ont découvert d'une façon tout à fait surprenante qu'il était possible de surmonter ces deux difficultés en préparant des produits d'addition du constituant du tissu et/ou du liquide biologiques concernés avec un colorant qui est synthétique ou tout au moins n'existe pas dans les fluides ou solutions physiologiques, en mettant en contact un échantillon à examiner avec une composition qui constitue le premier objet de la présente invention, et qui est constituée par le colorant, un milieu compatible avec le tissu et/ou le liquide biologiques et une substance capable de désactiver les molécules de colorant quand elle les

rencontre (extincteur).

Comme on vient de la dire, la composition qui forme le produit d'addition avec le constituant physiologique est formée par (a) un colorant choisi parmi la famille des azines, oxazines, acridines ou du xanthène, ou bien parmi  
5 certains colorants solubles dans l'eau de la famille des diazoïques ou du triphénylméthane; (b) un milieu compatible avec le constituant physiologique et constitué par une solution aqueuse contenant divers sels tels que NaCl, CaCl<sub>2</sub>  
10 et sels analogues, en une concentration telle, qu'elle soit sensiblement isotonique avec le composant physiologique (de 0,1 à 1% en poids) et d'autres composants en proportions plus petites, tels que glucose, mélanges tampons, etc. sont ajoutés afin de conditionner la vitalité des cellules présentes, le  
15 pH du milieu pouvant varier jusqu'à un certain point autour de la neutralité (pH de 4,5 à 9,5) et de petites quantités de solvant organique pouvant être ajoutées afin d'augmenter la solubilité du colorant; et (c) un extincteur (c'est-à-dire une substance provoquant rapidement la désactivation des  
20 molécules du colorant quand les deux molécules se rencontrent) qui peut être du iodure de potassium (ou de sodium) (environ de 10<sup>-2</sup> à 0,2 M), ou bien le sel d'un métal de transition paramagnétique (de 10<sup>-2</sup> à 0,2 M de Co, Fe, Ni, choisi sous la forme de CoCl<sub>2</sub> ou produits analogues), éventuellement en  
25 présence d'une substance de chélation telle que l'acide éthylènediaminotétracétique (EDTA); ou enfin l'extincteur utilisé peut être une quantité définie d'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) dissous dans l'eau (par exemple en saturant la solution de l'échantillon avec de l'oxygène à une température déterminée).

30 La composition établie précédemment est utilisée pour réaliser un procédé d'examen pour des tissus et/ou des liquides biologiques, procédé qui à son tour constitue le second objet de la présente invention.

Ce procédé consiste à traiter d'abord l'échantillon de  
35 substance à examiner avec la composition, à irradier la substance obtenue avec un premier rayonnement de lumière pulsée, à faire traverser l'échantillon ainsi traité par un second rayonnement de lumière monochromatique et à analyser

l'intensité optique de sortie de ce dernier en fonction du temps.

Les auteurs de la présente invention ont découvert de cette façon que les signaux dus à l'absorption des états métastables des molécules de colorant liées dans les cellules à examiner sont nettement différents en ce qui concerne la variation d'amplitude et/ou du temps, des signaux dus aux molécules en solution ou provenant d'autres cellules.

Le procédé réussit ainsi à caractériser chacune des cellules présentes dans le tissu.

Ce procédé a été trouvé particulièrement approprié pour l'examen des cultures de cellules de fermentation, dans la distinction des cellules mortes, des cellules vivantes, et des cellules de levure, des cellules bactériennes; et dans l'analyse quantitative des leucocytes du sang.

Le procédé peut d'une part fournir des mesures automatiques (demandant juste quelques secondes) en remplaçant les procédés classiques longs et ennuyeux nécessaires dans le cas du microscope optique. Il peut également réussir à révéler des caractéristiques non visibles à l'oeil nu, concernant l'interaction spécifique moléculaire du colorant avec certains constituants des cellules.

Par conséquent, le procédé peut être utilisé pour des examens qui ne pouvaient pas être réalisés jusqu'à présent ou qui n'étaient possibles qu'en utilisant des procédés bien plus compliqués. En particulier, il est facile de prévoir son utilisation dans la diagnose des tumeurs à cause de la possibilité d'une détermination quantitative de l'interaction ADN-colorant.

La figure 1 est une représentation schématique, à titre d'exemple non limitatif, de l'appareil utilisé par les auteurs de la présente invention dans ces examens.

$S_1$  est la lampe à vapeur de mercure et  $S_2$  est le faisceau laser.  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$ ,  $L_4$  sont des lentilles de quartz.  $M_1$ ,  $M_2$  sont des miroirs et  $D_1$ ,  $D_2$  sont des détecteurs de l'état solide qui détectent l'impulsion du laser. MC est le monochromateur à grande luminosité. S indique la position de l'échantillon et PM est le photomultiplicateur. Les filtres et les diaphragmes

ne sont pas montrés pour plus de clarté.

Le faisceau de lumière pulsée est obtenu à partir d'un laser à Néodyme, notamment d'un laser du commerce "YAG" (Chromatix mod. 1000) qui émet des impulsions de lumière de  
5 0,1 à 0,5 mJ d'environ 150 ns en longueur et avec une fréquence de répétition d'environ 50 Hz.

La couleur du laser varie du bleu ( $\lambda = 473 \text{ nm}$ ) au proche infra-rouge. Le faisceau d'observation est produit par une lampe à vapeur de mercure à haute pression, équipée de filtres  
10 appropriés. Les deux faisceaux sont focalisés dans une zone de l'échantillon d'environ 0,2 mm de diamètre d'une façon telle, qu'ils forment un angle d'environ  $15^\circ$  entre eux. La cellule à échantillon a une épaisseur de 2 mm. La lumière provenant de la lampe traverse un monochromateur à grande ouverture et  
15 est envoyée à un photomultiplicateur ("Philips XP 1113"). Le signal de sortie électrique du photomultiplicateur est enregistré continuellement sous forme de la valeur moyenne et est également envoyé à un pré-amplificateur avec une bande passante comprise entre 0,5 KHz et 30 MHz puis amplifié,  
20 enregistré dans des mémoires numériques et stocké dans un petit ordinateur ("LABEN 70").

Le signal obtenu à partir d'une simple impulsion est enregistré et ajouté à ceux de centaines d'impulsions analogues. Donc, une moyenne des signaux est obtenue dans  
25 laquelle le bruit est réduit d'un facteur supérieur à 10 par rapport au signal provenant d'une seule impulsion. Etant donné que la fréquence de répétition des impulsions est relativement élevée, le résultat des mesures est obtenu en exactement quelques secondes. Le stockage dans le ordinateur  
30 permet de reproduire et de traiter le signal en utilisant un ruban magnétique, des traceurs de courbe, etc.

Le signal stocké contient une quantité considérable de données telles que l'amplitude de l'absorption à diverses longueurs d'onde d'observation et sa variation avec le temps.

35 Si cette amplitude est  $V(\lambda, t)$ , il est généralement possible de fixer  $\lambda$  et  $t$  de façon telle que :  
 $V(\lambda_0, t_0) = k_1 + k_2 n_c$ , où  $n_c$  est le nombre de cellules correspondant au travail des auteurs de la présente invention, et

$k_1$  et  $k_2$  sont des constantes pouvant être obtenues par un processus d'étalonnage, c'est-à-dire en introduisant un échantillon de composition connue dans l'appareil.

La présente invention est illustrée par les exemples descriptifs et non limitatifs ci-après.

#### EXEMPLE 1

Examen de culture de cellules. Essai de vitalité.

Cet examen est appliqué à des cultures de levure du type *Saccharomyces*, telles que le *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces fragilis* ou levures analogues.

L'essai donne une mesure quantitative du nombre de cellules mortes présentes dans la fermentation.

Procédé expérimental. On mélange l'échantillon de cellules à examiner avec un mélange contenant  $10^{-4}$  M de colorant bleu "Trypan Blue", simultanément avec, par litre, 0,1 g de  $\text{NaN}_3$ , 6,8 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  réglé à pH 7,2 avec KOH, et 8,76 g de NaCl. On ajoute du  $\text{CoCl}_2$  à une concentration finale de  $10^{-2}$  M en présence d'une concentration égale de EDTA. Le mélange est agité pendant quelques minutes, puis mesuré avec l'appareil décrit ci-dessus.

L'échantillon est irradié dans une cellule de 2 mm en utilisant le laser pulsé à  $\lambda = 659$  nm, et les variations de l'absorption à  $\lambda = 405$  et 435 nm sont observées après 1  $\mu$ s de retard provenant de l'impulsion laser. L'étalonnage est nécessaire afin de mesurer l'amplitude observée par rapport à l'amplitude de l'impulsion laser, l'alignement optique, etc. Dans ce but, on utilise une suspension dans laquelle les cellules de levure sont comptées puis toutes tuées par ébullition pendant quelques minutes.

#### Résultats :

Sur la figure 2, les ordonnées représentent l'absorption temporaire (en millivolts) observée à  $\lambda = 435$  nm quand une suspension contenant des cellules de *Saccharomyces lactis* partiellement tuées et du "Trypan Blue" est soumise à un rayonnement pulsé à 659 nm comme décrit précédemment. Les abscisses représentent la durée en microsecondes ( $\mu$ s).

Sur la figure 3, les ordonnées représentent l'amplitude temporaire (en mV) observée après une  $\mu$ s depuis le début de l'impulsion laser. Les abscisses représentent le pourcentage de cellules mortes dans la suspension lu par des moyens clas-  
5 siques, c'est-à-dire par comptage au microscope optique.

La corrélation est très bonne et permet de mesurer auto-  
matiquement le nombre de cellules mortes en exactement quelques  
secondes. La sensibilité pouvant être obtenue peut varier  
autour de 100 à 1 000 cellules/mm<sup>3</sup>, c'est-à-dire moins de 1%  
10 de la population totale présente dans le bouillon.

#### EXEMPLE 2

Examen des cultures de cellules. Contamination par  
diverses souches.

La même composition utilisée pour le mélange réactionnel  
15 de l'exemple 1, contenant le colorant bleu "Trypan Blue",  
permet de distinguer divers types de cellules dans une fermenta-  
tion. Pour deux levures différentes du type Saccharomyces,  
l'amplitude temporaire observée à  $\lambda = 435$  nm varie différemment  
avec le temps, par exemple la demi-vie (c'est-à-dire le temps  
20 durant lequel l'amplitude temporaire est réduite d'un facteur  
de 2) est de 2,3  $\mu$ s pour le Saccharomyces lactis et de 1,7  $\mu$ s  
pour le Saccharomyces fragilis.

On n'observe pas d'amplitude temporaire dans les cellules  
bactériennes mortes du type Arthrobacter. Le procédé est par  
25 conséquent approprié pour examiner la contamination de levures  
dans des cultures bactériennes, ou pour différencier diverses  
levures. Dans ce but, l'échantillon à analyser est prélevé,  
toutes les cellules présentes sont tuées par ébullition pendant  
quelques minutes, l'échantillon est ensuite traité avec le  
30 mélange contenant le colorant et on mesure l'amplitude et le  
temps d'affaiblissement de l'amplitude temporaire enregistrée  
à  $\lambda = 435$  nm quand l'échantillon est irradié avec des impulsions  
de  $\lambda = 650$  nm.

#### EXEMPLE 3

35 Mesure de la quantité d'ADN présente dans les tissus.

Le procédé est applicable pour la mesure quantitative des  
acides nucléiques présents dans les globules humains. Les



globules blancs du sang de diverses compositions sont utilisés pour cet essai.

Des échantillons contenant divers globules renfermant des quantités facilement mesurables d'ADN sont obtenus à partir de sang humain traité à l'héparine par des procédés connus, comprenant la centrifugation dans un gradient de Ficoll. Un gradient de Ficoll linéaire de 18 % à 15 % est utilisé, les globules stratifiés sur le gradient sont centrifugés pendant 5 minutes à 50 x g et pendant 7 minutes à 250 x g. Diverses fractions sont obtenues qui, une fois purifiées, contiennent des lymphocytes, des monocytes et des granulocytes avec de petites quantités de corpuscules rouges. Les globules blancs ainsi obtenus sont comptés et analysés sur des lamelles au microscope en utilisant les procédés classiques. Ceci permet d'évaluer l'ADN contenu dans l'échantillon quand le taux moyen de chromatine dans chaque type de globule est connu.

Les diverses fractions obtenues sont colorées les unes et les autres séparément puis mélangées entre elles dans des proportions connues.

Afin de les colorer, les globules sont centrifugés et mis en suspension dans une solution contenant  $5 \times 10^{-5}$  M d'Orangé d'acridine dans une solution physiologique contenant 0,05 M d'un tampon phosphate à pH 7,2 et contenant également  $10^{-2}$  M de  $\text{CoCl}_2$  et  $10^{-2}$  M de EDTA.

La suspension obtenue est irradiée par impulsions en utilisant l'appareil décrit plus haut à une longueur d'onde comprise entre  $\lambda = 473$  et  $\lambda = 532$  nm.

La suspension est observée avec une lumière continue à  $\lambda = 435$  nm.

Le même procédé est suivi pour un échantillon contenant les mêmes réactifs mais sans le colorant. Cette dernière opération est nécessaire parce que de petites quantités de carboxy-hémoglobine présentes pourraient contribuer à l'absorption temporaire.

L'absorption temporaire obtenue en utilisant l'échantillon sans colorant est soustrait de celle obtenue avec les mélanges complets, pour obtenir les résultats montrés sur la figure 4.

Les ordonnées représentent l'amplitude de l'absorption temporaire (en millivolts), et les abscisses représentent le temps en  $\mu$ s.

La variation de l'absorption temporaire est observée à  $\lambda = 435$  nm quand on irradie une suspension contenant des granulocytes humains et de l'orangé d'acridine à  $\lambda = 532$  nm comme décrit précédemment.

L'amplitude de l'impulsion de 1  $\mu$ s après irradiation avec le laser est proportionnelle au taux d'ADN de l'échantillon comme le montre la figure 5. Sur cette figure, l'amplitude de l'absorption temporaire (en mV) est montrée en fonction du taux d'ADN (exprimé en mg/l) pour divers types de globules, notamment les lymphocytes et les monocytes en diverses proportions, ou les monocytes seuls, ou les granulocytes seuls, ou tous les leucocytes.

Les échantillons contiennent diverses quantités d'érythrocytes, et proviennent de divers donneurs.

Le fait que cette proportionnalité soit obtenue pour divers taux de différents globules prélevés sur divers individus permet de supposer que le procédé peut également être appliqué d'une façon fiable aux tissus biologiques d'autre origine, tels que les tissus épithéliaux, etc.

La mesure du taux d'ADN en même temps que la mesure du nombre de globules présents dans le tissu pourrait être importante dans la diagnose initiale des états cancéreux.

#### EXEMPLE 4

Caractérisation des leucocytes dans le sang humain.

Cette caractérisation est appliquée à des échantillons de sang qui a été rendu non-coagulant.

Elle fournit une évaluation quantitative du nombre total de leucocytes et du nombre de granulocytes, de monocytes et de lymphocytes.

Mode opératoire. A un échantillon de sang veineux humain, qui a été rendu non coagulant avec de l'héparine en une concentration de 0,1 à 0,2 mg/ml de sang, ou avec le sel de sodium de l'EDTA en une concentration de 1 mg/ml, on ajoute une solution contenant 3,5 % de dextrane (poids moléculaire

250 000) jusqu'à ce qu'on ait une concentration finale de 1,5 %, le mélange étant ensuite maintenu dans un thermostat à 37°C pendant 20 minutes. Le liquide surnageant est éliminé et contient les familles de globules blancs et environ 1 % de globules rouges, puis on ajoute de l'eau distillée afin de ramener la concentration en sel à 0,25 ‰. Après exactement 30 secondes, le caractère isotonique est rétabli en ajoutant une solution aqueuse contenant 3,5 ‰ de NaCl. Les globules sont recueillis par centrifugation à 400xg pendant 5 minutes et sont ensuite délayés dans une solution de NaCl à 0,9 % ou dans un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,1 en un volume tel, qu'il y ait 8000 lymphocytes environ par mm<sup>3</sup>. La récupération des leucocytes est d'environ 95 % avec une composition en % qui ne peut pas être distinguée de celle du sang; les globules rouges qui restent sont dans un rapport d'environ 1/1 avec les globules blancs. Les mesures sont effectuées sur 200 microlitres d'une suspension de globules, dans une cellule ayant un trajet optique de 2 mm, où ont été ajoutés un colorant et un extincteur. Les globules peuvent être fixés au préalable.

Plus particulièrement, on utilise les techniques de coloration suivantes:

A la suspension de globules, on ajoute l'extincteur CoCl<sub>2</sub>-EDTA plus le colorant vert "Brillant Green" en les concentrations finales de 10<sup>-2</sup> et 9.10<sup>-4</sup> M, respectivement. Une autre technique de coloration consiste à fixer les globules avec de l'éthanol à une concentration finale de 12 ‰. Après 1 minute, on ajoute le CoCl<sub>2</sub>-EDTA et le colorant bleu "Brillant Cresyl Blue" en les concentrations finales de 10<sup>-2</sup> et 5. 10<sup>-5</sup> M, respectivement. Un troisième procédé de coloration qui s'est révélé utile est identique au second décrit dans la présente demande, mais le colorant bleu est le "Nile Blue" à 8 . 10<sup>-5</sup> M.

Les échantillons ainsi obtenus sont ensuite irradiés avec le système laser à impulsions, décrit au début de la présente demande, à  $\lambda = 659$  nm, et sont observés ensuite avec une lumière monochromatique à  $\lambda = 435$  nm et  $\lambda = 547$  nm.

Avec deux techniques de coloration différentes, on peut ainsi obtenir quatre absorptions temporaires différentes dont les caractéristiques sont telles, qu'elles sont en corrélation

avec les amplitudes à mesurer.

Résultat :

5 L'observation des échantillons sanguins ainsi traités correspond à celle obtenue par les procédés classiques, c'est-à-dire par l'observation au microscope des raies du sang complet. Sur les figures 6 et 7, on a reporté à titre d'exemple quelques-unes de ces absorptions temporaires. Plus particulièrement, la figure 6 montre l'amplitude (en milli-volts) observée à  $\lambda = 547$  nm dans l'échantillon coloré avec le colorant bleu "Brillant Cresyl Blue" et fixé avec de l'éthanol : en abscisses, est porté le temps en microsecondes. L'amplitude  $\Delta V$  ainsi mesurée sur la figure entre le maximum et la valeur après de longues durées est proportionnelle au nombre total de monocytes. Il faut remarquer que dans cet exemple, la présence de Co-EDTA est essentielle afin de déterminer la disparition des signaux provenant des autres globules ou des colorants libres. Sur la figure 7, sont reportées les absorptions temporaires observées à  $\lambda = 435$  nm dans l'échantillon coloré avec le colorant vert "Brillant Green" (les ordonnées sont en millivolts et les abscisses en microsecondes, comme dans le cas précédent). La largeur du palier correspondant à l'activation de l'état triplet du colorant, qu'on suppose lié au noyau cellulaire, comme on peut le voir au microscope, peut être en bonne corrélation avec le nombre total de leucocytes.

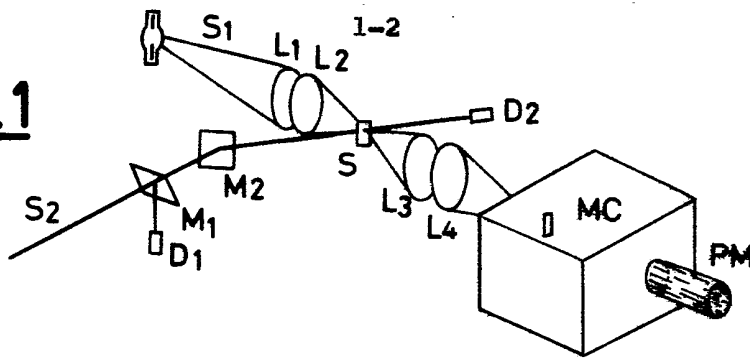
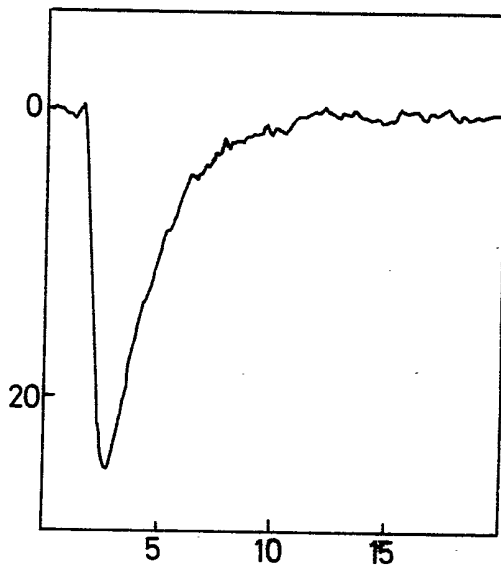
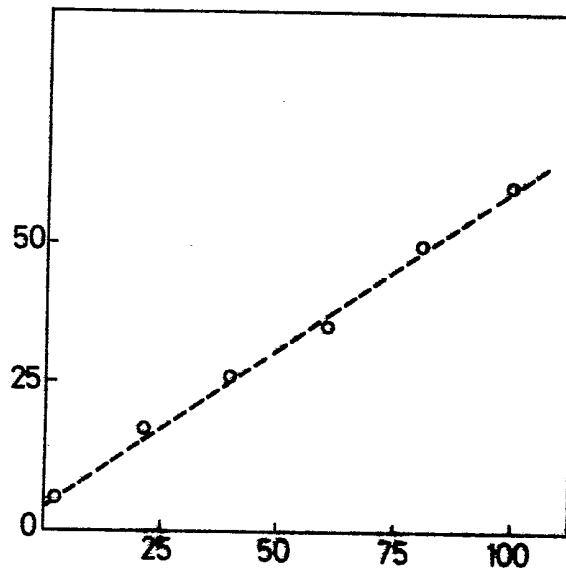
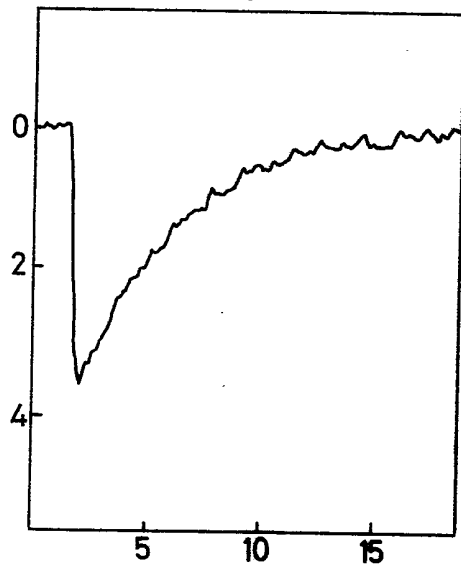
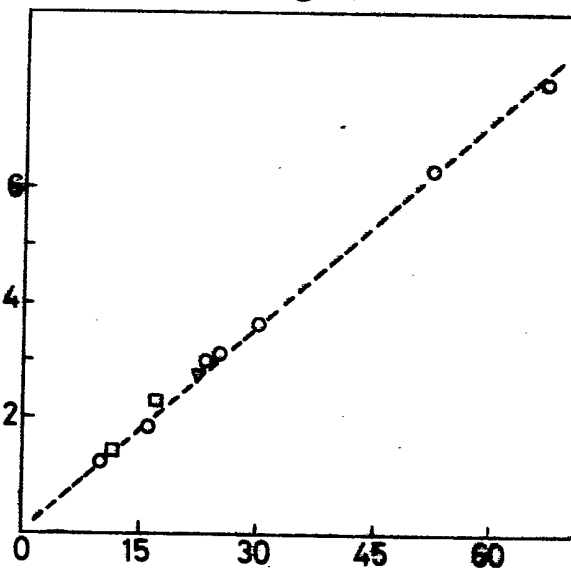
25 La tendance à l'affaiblissement est, de plus, à deux phases, comme on peut le voir sur le dessin. Le stade rapide qui est communément mesuré aussi bien à  $\lambda = 435$  nm qu'à  $\lambda = 547$  nm, est finalement proportionnel au nombre de lymphocytes. Ainsi, on a déterminé les trois paramètres indépendants (nombre de lymphocytes (l), nombre de monocytes (m) et nombre de granulocytes (g), le nombre total de leucocytes (n) étant égal à la somme des trois, c'est-à-dire  $n = l + m + g$ .

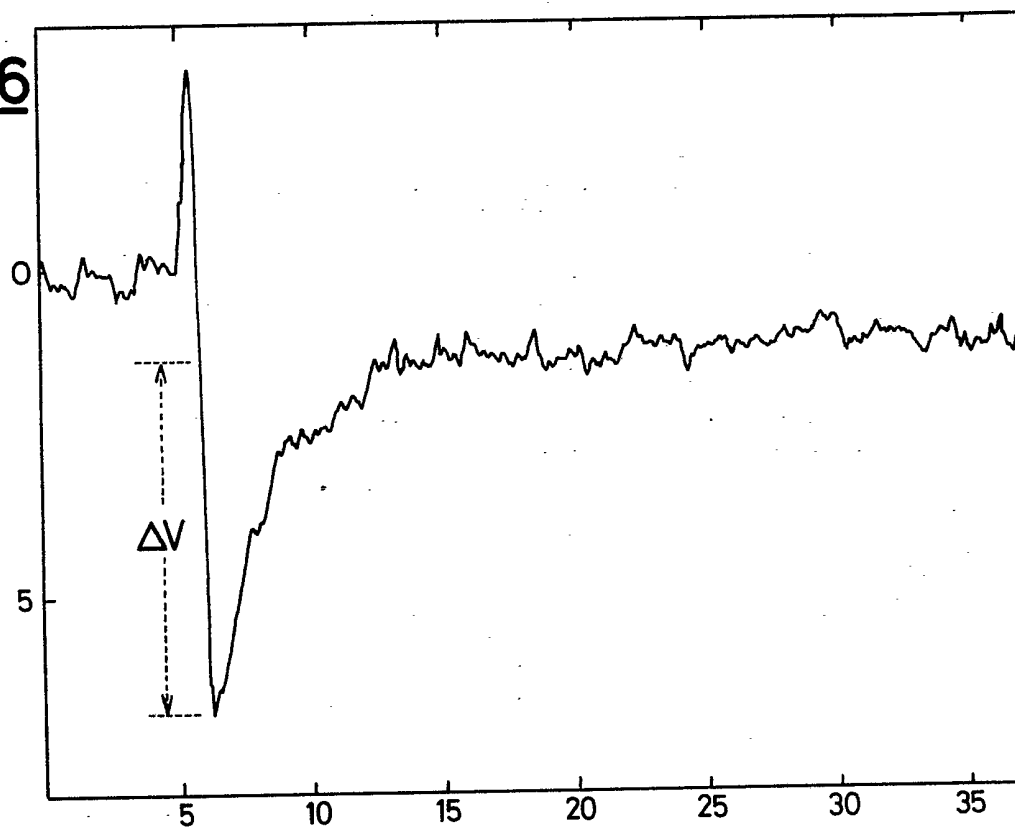
35 Il faut remarquer que une seule petite fraction de l'information contenue dans le tracé enregistré pour les absorptions temporaires observées a été utilisée pour ces déterminations et l'une permet l'observation indépendante du temps

d'affaiblissement des stades triplet et les rapports entre les amplitudes à différentes valeurs de  $\lambda$ , pour effectuer des contrôles d'autre nature tels que par exemple pour indiquer la présence de cellules pathologiques.

REVENDEICATIONS

1. Composition appropriée pour l'examen des constituants des tissus et/ou liquides biologiques, caractérisé par le fait qu'elle est constituée par :
- a) un colorant choisi parmi les familles du xanthène, des azines, des oxazines ou des acridines, ou bien parmi des colorants solubles dans l'eau de la famille des diazoïques ou du triphénylméthane;
  - b) un milieu compatible avec le tissu et/ou le liquide biologiques;
  - c) une substance pouvant désactiver rapidement les molécules de colorant quand elle les rencontre (c'est-à-dire un extincteur).
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée par le fait que le colorant est présent à une concentration comprise entre  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  moles.
3. Procédé pour l'examen des tissus et/ou des liquides biologiques, caractérisé par le fait qu'il consiste à traiter l'échantillon concerné avec une composition comprenant :
- a) un colorant choisi parmi les familles du xanthène, des azines, des oxazines ou des acridines, ou bien des colorants solubles dans l'eau de la famille des diazoïques ou du triphénylméthane;
  - b) un milieu compatible avec le tissu et/ou le liquide biologiques;
  - c) une substance capable de désactiver rapidement les molécules de colorant quand elle les rencontre, (c'est-à-dire un extincteur),
- puis à irradier le mélange résultant avec un premier faisceau de lumière pulsée, et à faire passer un second faisceau de lumière monochromatique à travers l'échantillon ainsi traité, et à analyser l'intensité optique de sortie de ce second faisceau en fonction du temps.

**Fig.1****Fig.2****Fig.3****Fig.4****Fig.5**

**Fig.6****Fig.7**