

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
13 septembre 2007 (13.09.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2007/101932 A2**

- (51) Classification internationale des brevets : **Non classée**
- (21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2007/000380
- (22) Date de dépôt international : 2 mars 2007 (02.03.2007)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :  
0601974 6 mars 2006 (06.03.2006) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
**HORIBA ABX SAS** [FR/FR]; Rue du Caducée, Parc  
Euromédecine, F-34000 Montpellier (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **NERIN,  
Philippe** [FR/FR]; 2 li Pesquié, F-30114 Nages et  
Solorgues (FR). **MERCHEZ, Benoît** [FR/FR]; 14, rue  
Stéphane Grapelli, F-34725 Saint André De Sangonis  
(FR). **GINEYS, Jean-Philippe** [FR/FR]; Mas Saint Loup,

F-30440 Roquedur (FR). **LEFEVRE, Didier** [FR/FR];  
160, rue du Mazet, F-34980 Saint Clément de Rivière  
(FR).

(74) Mandataire : **DOMANGE, Maxime**; Cabinet BEAU  
DE LOMENIE, 232, avenue du Prado, F-13295 Marseille  
Cedex 08 (FR).

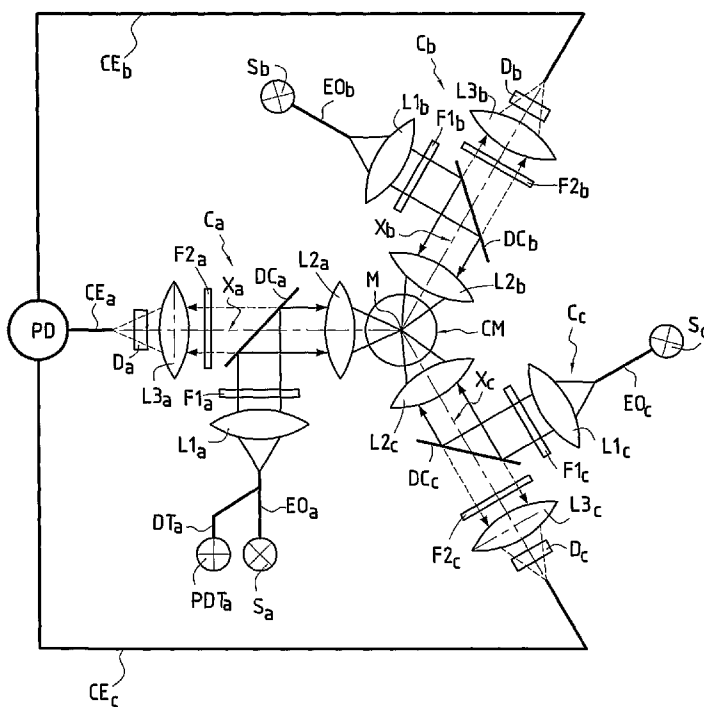
(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,  
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,  
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,  
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR MEASURING PHOTOLUMINESCENCE, ABSORPTION AND DIFFRACTION OF  
MICROSCOPIC OBJECTS IN A FLUID

(54) Titre : DISPOSITIF ET PROCÉDÉ DE MESURE DE PHOTOLUMINESCENCE, D'ABSORPTION ET DE DIFFRACTION  
D'OBJETS MICROSCOPIQUES DANS UN FLUIDE



(57) Abstract: The invention concerns a device and a method for measuring photoluminescence in a fluid contained in a measuring vessel [CM]. According to the invention, the fluid in the measuring vessel [CM] receives simultaneously at least two excitation beams from two optical systems [Ci]. Said optical systems [Ci] are positioned so that their axes [Xi] form between them a non-null and separate angle of 180° about the measuring vessel [CM]. A measurement of photoluminescence is deduced according to the invention from a coupling of data obtained from the emission beams captured simultaneously by the capturing elements [CEi]. The optical systems [Ci] are further positioned such that there exists at least one partial overlapping beam [FCb<sub>a</sub>] between the excitation beam and the source [Sb] of a first optical system [Cb] and the emission beam captured by the capturing element [CEa] of a second optical system [Ca]. The device is further provided with at least one so-called capturing element [DTa] in the neighbourhood of at least one of the sources [Sa] to capture a light at the wavelength of excitation in the partial overlapping beam [FCb<sub>a</sub>], a measurement of absorbance and/or of diffraction being deduced from data obtained from said light

captured by the attenuating capturing element [DTa].

[Suite sur la page suivante]

WO 2007/101932 A2



GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

**Publiée :**

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

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

---

**(57) Abrégé :** L'invention concerne un dispositif et un procédé de mesure de photoluminescence dans un fluide présent dans une cuve de mesure [CM]. Selon l'invention, le fluide dans la cuve de mesure [CM] reçoit simultanément au moins deux faisceaux d'excitation en provenance de deux systèmes optiques [Ci]. Ces systèmes optiques [Ci] sont positionnés pour que leurs axes [Xi] fassent entre eux un angle non nul et distinct de 180° autour de la cuve de mesure [CM]. Une mesure de photoluminescence est déduite selon l'invention d'un couplage de données obtenues à partir des faisceaux d'émission capturés simultanément par les éléments de capture [CEi]. Les systèmes optiques [Ci] sont en outre positionnés de telle manière qu'il existe au moins un faisceau de recouvrement partiel [FCb<sub>a</sub>] entre le faisceau d'excitation de la source [Sb] d'un premier système optique [Cb] et le faisceau d'émission capté par l'élément de capture [CEa] d'un second système optique [Ca]. Le dispositif est en outre muni d'au moins un élément de capture [DTa] dit d'extinction au voisinage d'au moins une des sources [Sa] pour capter une lumière à la longueur d'onde de l'excitation dans le faisceau de recouvrement partiel [FCb<sub>a</sub>], une mesure d'absorbance et/ou de diffraction étant déduite de données obtenues à partir de la lumière captée par l'élément de capture d'extinction [DTa].

Titre de l'invention

Dispositif et procédé de mesure de photoluminescence, d'absorption et de diffraction d'objets microscopiques dans un fluide.

5 Arrière-plan de l'invention

La présente invention se rapporte au domaine général des dispositifs et procédés de mesure de photoluminescence dans un fluide présent dans une cuve de mesure. De tels dispositifs et procédés étant en particulier destinés au comptage d'objets microscopiques dans un fluide, par exemple biologique.

10 Plus précisément, l'invention concerne les dispositifs basés sur l'utilisation de sources de lumière partiellement cohérentes, telle une diode électroluminescente, comme moyen d'excitation de molécules, par exemple fluorescentes, présentes dans un fluide.

La photoluminescence est un phénomène radiatif sensiblement isotrope  
15 induit lors du retour à l'état fondamental d'une molécule excitable et excitée par une énergie lumineuse à une longueur d'onde qui lui est propre. L'émission de lumière de fluorescence se fait toujours à une fréquence inférieure à celle d'excitation. La mesure s'effectue généralement en dehors de l'axe d'excitation par la lumière incidente et au travers d'un filtre chromatique ne transmettant au  
20 détecteur que la bande spectrale d'intérêt.

L'invention s'intéresse en particulier au développement de moyens optiques et optoélectroniques permettant la détection de très faibles signaux de photoluminescence tels ceux issus du marquage de biomolécules, protéines ou acides nucléiques par exemple.

25 En biologie animale, la mesure des signaux de photoluminescence est particulièrement utile au praticien pour élaborer un diagnostic et plus spécifiquement un diagnostic cytologique pour lequel la détection et le comptage de lignées cellulaires rares comme les cellules souches hématopoïétiques ou autres éléments figurés du sang ou d'un autre liquide biologique sera  
30 particulièrement utile.

Les mesures de photoluminescence des éléments biologiques, que celle-ci soit naturelle ou induite par une sonde moléculaire, sont largement utilisées dans

les domaines de la cytométrie de flux et des automates de cytologie notamment hématologique.

Les sondes moléculaires utilisées peuvent être des colorants vitaux ou supravitaux ayant une affinité intrinsèque pour un type particulier de molécules  
5 tels les colorants intercalant des acides nucléiques. Elles peuvent aussi être des sondes immunologiques tels des produits conjugués composés d'un anticorps sur lequel est greffée une molécule colorante, généralement un fluorochrome, seul ou en tandem, ou parfois un nano cristal. L'anticorps va pouvoir se lier de façon spécifique à des molécules ou portions de molécules appelées antigènes ou  
10 déterminants antigéniques qu'il sera alors possible de décompter par mesure de photoluminescence.

Le mode de marquage par la mise en œuvre de sondes immunologiques s'est largement répandu pour l'identification cytologique notamment à l'aide des techniques de cytométrie en flux.

15 Pour obtenir la sensibilité nécessaire à de telles mesures, les sources de lumière d'excitation doivent pouvoir délivrer une énergie suffisante afin que chaque élément biologique marqué puisse être détecté avec suffisamment de sensibilité lors de son passage devant le faisceau d'excitation.

Pour obtenir cette puissance, la plupart des cytomètres ou automates  
20 intégrant ces techniques de fluorescence, utilisent des sources lumineuses de type laser, que ce soit gaz ou solide ou autres, ou des sources semi conducteur comme les diodes laser et autres laser dérivés, par exemple DPSS pour Diode-Pumped Solid-State.

Les sources de type laser permettent d'avoir une très bonne cohérence  
25 spatiale ainsi qu'une grande puissance mais la structure gaussienne du faisceau laser affecte l'homogénéité du champ de lumière au point de mesure. Il est nécessaire de mettre en œuvre une optique complexe, donc coûteuse, pour obtenir une homogénéité de ce champ supérieure à 0,5 % au point de mesure.

L'utilisation de sources laser présente donc l'inconvénient majeur du coût  
30 qui peut, dans le cas notamment des dispositifs à faisceau d'excitation ultra violet, à colorant ou multibandes, être prohibitif et réserver leur usage à des dispositifs très particuliers dans des domaines pointus de l'analyse biologique.

Les diodes laser, moins coûteuses, présentent l'avantage d'avoir une grande densité de puissance liée à leur forte cohérence spatiale, mais le choix des longueurs d'onde est plus restreint par rapport aux choix procurés par les diodes électroluminescentes.

5 A ce sujet, il est connu, par exemple du document WO 00/57161, d'utiliser de telles sources de faible cohérence spatiale, comme des diodes électroluminescentes, dans un cytomètre de flux.

La figure 1 représente un tel dispositif utilisant généralement des sources de faible cohérence spatiale, telles que des lampes à arc ou des diodes  
10 électroluminescentes. Un tel dispositif peut être utilisé pour une mesure de photoluminescence dans une cuve de mesure CM au centre de laquelle est injecté un fluide, par exemple biologique, à analyser. Le système optique proposé est généralement dit montage en mode d'épifluorescence. Le dispositif comprend une source de lumière S destinée à générer un faisceau d'excitation et  
15 un élément, par exemple un photodétecteur PD, destiné à capter la lumière d'un faisceau d'émission de photoluminescence.

On entend par les termes faisceau ou lumière ou rayonnement d'excitation, la lumière issue de la source de lumière servant à l'illumination du fluide à analyser.

20 On entend par les termes faisceau ou lumière ou rayonnement d'émission, la lumière issue de l'interaction inélastique du faisceau d'excitation avec des objets microscopiques présents dans le fluide à analyser telles que les lumières de fluorescence ou photoluminescence.

Dans ce dispositif dit en épifluorescence, le faisceau d'excitation généré  
25 par la source de lumière S et le faisceau d'émission capté par le photodétecteur PD sont coaxiaux le long d'un axe appelé axe du système X, la même optique permettant l'émission et la réception des lumières.

Le dispositif comprend une lame dichroïque DC pour dissocier les faisceaux d'excitation et d'émission.

30 Avantagusement, le dispositif comprend en outre deux filtres F1 et F2 respectivement destinés à filtrer la lumière de la source S émise en direction de la cuve de mesure CM et la ou les lumières de fluorescence résultant de

l'interaction inélastique de la lumière d'excitation émise par la source S avec des objets microscopiques du fluide présent dans la cuve de mesure CM.

Des optiques L1 et L3 permettent que les faisceaux d'excitation et d'émission soient des faisceaux parallèles lors de leur traversée des filtres F1 et F2 et de la lame dichroïque DC. Une lentille ou une combinaison optique L2 de  
5 grande ouverture numérique permet de focaliser le faisceau d'excitation sur un petit volume centré en un point de mesure M de la cuve de mesure CM.

La lumière de fluorescence issue d'un objet microscopique présent dans le fluide et passant au point M illuminé par le faisceau d'excitation est focalisée en  
10 un faisceau parallèle grâce à la lentille L2, transmise au travers de la lame DC, filtrée par le filtre F2 et reçue par le photodétecteur PD après focalisation par la lentille L3.

De manière générale, la puissance du faisceau d'excitation obtenue à la longueur d'onde centrale choisie par rapport au fluorochrome utilisé est faible.  
15 Cela réduit d'autant les capacités de discrimination des dispositifs connus dont les champs d'application sont restreints. Ils sont en effet limités à la détection de signaux de fluorescence élevés par exemple correspondant à un grand nombre d'épitopes ou à des marqueurs de rendement de fluorescence élevés.

## 20 Objet et résumé de l'invention

La présente invention a donc pour but principal de pallier les inconvénients présentés par les dispositifs de l'art antérieur en proposant un dispositif de mesure de photoluminescence et de mesure d'absorbance et/ou de diffraction précis, sensible et peu coûteux comprenant au moins deux systèmes  
25 optiques incluant chacun une source de lumière de faible cohérence spatiale envoyant un faisceau d'excitation vers la cuve de mesure selon un axe dit du système et un élément de capture d'un faisceau d'émission de photoluminescence centré sur l'axe du système, lesdits systèmes optiques fonctionnant simultanément et étant positionnés pour que leurs axes fassent  
30 entre eux un angle obtus non nul et distinct de 180° autour de la cuve de mesure, ladite mesure de photoluminescence étant déduite d'un couplage de données obtenues à partir des faisceaux d'émission capturés simultanément par les éléments de capture. Selon l'invention, les systèmes optiques sont positionnés

de telle manière qu'il existe au moins un faisceau de recouvrement partiel entre le faisceau d'excitation de la source d'un premier système optique et le faisceau d'émission capté par l'élément de capture d'un second système optique et en ce que le dispositif est muni d'au moins un élément de capture dit d'extinction au  
5 voisinage d'au moins une des sources pour capter une lumière à la longueur d'onde de l'excitation dans le faisceau de recouvrement partiel, une mesure d'absorbance et/ou de diffraction étant déduite de données obtenues à partir de la lumière captée par l'élément de capture d'extinction.

L'invention propose notamment de multiplier le nombre de systèmes  
10 optiques, utilisant une source de faible cohérence spatiale, tout en couplant les faisceaux d'émission reçus. Cela permet, pour  $n$  systèmes optiques, que la puissance d'excitation au point de mesure soit  $n$  fois plus importante que pour un seul système et permet que la puissance d'émission de photoluminescence reçue soit donc  $n^2$  fois plus importante que pour un seul système puisqu'elle est reçue  
15 sur  $n$  systèmes optiques simultanément. C'est le caractère isotrope des rayonnements d'émission de photoluminescence qui assure que la sensibilité de détection du dispositif soit augmentée de manière substantielle,  $n^2$  en l'occurrence, en augmentant le nombre  $n$  de systèmes optiques en épifluorescence. L'utilisation de sources de lumière de faible cohérence, sans  
20 chute préjudiciable de sensibilité, devient alors possible.

En outre, en considérant une excitation du volume de mesure par deux faisceaux d'excitation en provenance des deux systèmes fonctionnant simultanément, les lumières de fluorescence étant isotropes, des faisceaux d'émission de fluorescence sont collectés simultanément par les deux éléments  
25 de capture des deux systèmes optiques. Comme les deux systèmes sont montés en épifluorescence, c'est-à-dire qu'émission et réception se font le long d'un même axe en utilisant les mêmes optiques, et que les deux systèmes sont disposés de manière à faire un angle strictement obtus, le faisceau d'émission de fluorescence reçu par chaque système optique est angulairement décalé par  
30 rapport au faisceau d'excitation de l'autre système optique.

Le faisceau d'émission de fluorescence reçu est alors peu parasité par l'éclairage en lumière directe et également deux fois plus intense puisque deux faisceaux d'excitation sont utilisés au lieu d'un seul faisceau d'excitation comme

c'est le cas dans les dispositifs de l'art antérieur. Le dispositif selon l'invention est par conséquent plus précis et plus sensible.

En outre, les deux systèmes optiques faisant entre eux un angle obtus autour de la cuve de mesure, l'existence d'un faisceau de recouvrement, dans la  
5 mesure où son étendue est réduite, assure que le maximum de puissance arrive dans la cuve tout en générant un minimum de lumière parasite.

L'invention propose d'utiliser un élément de capture d'extinction apte à capter la lumière du faisceau de recouvrement qui révèle des modifications d'intensité signes qu'une absorption et/ou qu'une diffraction par un objet  
10 microscopique ayant traversé le faisceau de recouvrement a eu lieu. L'utilisation d'un élément de capture adapté permet de quantifier cette absorption.

Dans un mode de réalisation de l'invention, le dispositif comprend un nombre impair de systèmes optiques positionnés pour que, par paire, leurs axes fassent entre eux des angles obtus non nuls et distincts de  $180^\circ$  autour de la  
15 cuve de mesure.

Selon une caractéristique particulière, les systèmes optiques sont positionnés pour que leurs axes fassent entre eux des angles identiques autour de la cuve de mesure.

Avantageusement, le nombre de systèmes optiques est égal à trois. Le  
20 dispositif comprend alors trois systèmes optiques positionnés autour de la cuve de mesure de telle manière que leurs axes fassent entre eux des angles identiques autour de la cuve de mesure.

Cette caractéristique particulière permet de limiter l'encombrement stérique autour de la cuve de mesure tout en multipliant par trois l'intensité de  
25 chaque faisceau d'émission de fluorescence reçu par chaque élément de capture en provenance de la cuve de mesure CM par rapport à une excitation avec un seul système optique.

En outre, les positions à  $120^\circ$  autour de la cuve de mesure des systèmes optiques et la nécessité d'avoir un faisceau de recouvrement requiert l'utilisation  
30 de faisceaux d'excitation et d'émission ayant de grandes ouvertures numériques. Cela présente l'avantage d'augmenter d'autant la puissance destinée à l'excitation des fluorochromes dans la cuve.

De plus, en utilisant de telles sources à grandes ouvertures numériques, on obtient une grande uniformité du champ de lumière. L'utilisation de trois systèmes optiques permet donc une synergie d'effets positifs.

5 Aussi, la mise en œuvre de trois systèmes optiques représente une configuration préférentielle en termes d'angles entre les systèmes optiques, de puissance lumineuse disponible, de recouvrement, d'uniformité du champ de lumière, de coût et de sensibilité.

10 On note cependant que bon nombre d'avantages de la configuration à trois systèmes optiques sont indépendants de la présence ou non d'un faisceau de recouvrement et d'un élément de capture d'extinction. En outre, cette configuration peut tout à fait être mise en œuvre pour une mesure de fluorescence sans mesure d'extinction, utilisant des sources de faible cohérence spatiale, indépendamment de la présence ou non d'un faisceau de recouvrement.

15 Dans une mise en œuvre avantageuse, les éléments de capture du faisceau d'émission sont reliés à un même photodétecteur ou à un même ensemble de photodétecteurs.

20 Cette mise en œuvre permet de sommer les signaux de fluorescence reçus simultanément par les éléments de capture directement au sein du photodétecteur commun. Les données sont alors couplées de suite lors de leur acquisition par le même photodétecteur. Cette caractéristique permet de réaliser une addition optique des signaux lumineux. Les photodétecteurs sont généralement sensibles à une unique longueur d'ondes. L'utilisation d'un unique photodétecteur est donc plutôt adaptée lorsqu'une seule longueur d'ondes de photoluminescence est attendue, ce qui correspond généralement à une unique  
25 longueur d'ondes d'excitation.

L'utilisation d'un même ensemble de photodétecteurs pour les éléments de capture permet en revanche de détecter plusieurs longueurs d'ondes de photoluminescence. Cela sera donc mieux adapté lorsque plusieurs longueurs d'ondes de photoluminescence sont attendues, ce qui correspond plus  
30 généralement à une excitation sur plusieurs longueurs d'onde. Cela correspondra par exemple à une configuration où les trois systèmes optiques n'émettent pas nécessairement chacun une lumière de même longueur d'ondes.

Dans tous les cas, les photodétecteurs réalisent une addition optique des signaux lumineux.

Avantageusement, le ou les photodétecteurs sont reliés à des moyens de traitement de données aptes à déduire la mesure de photoluminescence à partir  
5 des données reçues en provenance du ou des photodétecteurs.

Dans une mise en œuvre, l'élément de capture d'extinction est relié à un photodétecteur, lui-même relié à des moyens de traitement de données aptes à déduire une mesure d'absorbance et/ou de diffraction à partir des données  
10 reçues en provenance du photodétecteur.

Selon une caractéristique particulière de l'invention, les éléments de capture des faisceaux d'émission et/ou d'extinction sont des fibres optiques de section circulaire ou rectangulaire.

Selon une autre caractéristique particulière de l'invention, les sources de lumière incluent une diode électroluminescente de faible cohérence spatiale  
15 couplée à un élément optique destiné à rendre homogène le faisceau d'excitation.

Avantageusement, l'élément optique est un conducteur de lumière, par exemple une fibre optique.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la cuve de mesure a une section polyédrique dans le plan où sont placés les systèmes optiques, le  
20 polyèdre étant tel que ses faces soient perpendiculaires aux axes des systèmes optiques.

Dans le cas où trois systèmes optiques placés à des angles réguliers autour de la cuve sont utilisées, la cuve présente donc une section triangulaire  
25 équilatérale.

Dans un autre mode de réalisation, la cuve de mesure est cylindrique.

Avantageusement, chaque système optique inclut des moyens de correction d'aberration pour corriger les aberrations introduites par la géométrie de la cuve de mesure sur les différents faisceaux.

Dans une application particulièrement avantageuse de l'invention, le  
30 fluide est un fluide biologique.

Dans cette application, un dispositif selon l'invention peut être utilisé pour la détection et le comptage d'éléments biologiques marqués en fluorescence. Les

applications sont multiples dans le domaine de la cytométrie de flux notamment et plus particulièrement pour l'identification et la numération de cellules biologiques dans des échantillons de sang périphérique ou encore de moelle osseuse ou bien tout autre liquide biologique.

5 L'invention concerne également un procédé de mesure de photoluminescence et de mesure d'absorbance et/ou de diffraction dans un fluide présent dans une cuve de mesure, caractérisé en ce que le fluide dans la cuve de mesure reçoit simultanément au moins deux faisceaux d'excitation en provenance de deux systèmes optiques comprenant chacun une source de  
10 lumière de faible cohérence spatiale envoyant ledit faisceau d'excitation vers la cuve de mesure selon un axe dit du système et un élément de capture destiné à recevoir un faisceau d'émission de fluorescence centré sur l'axe du système en provenance du fluide, lesdits systèmes optiques étant positionnés pour que leurs axes fassent entre eux un angle obtus non nul et distinct de  $180^\circ$  autour de la  
15 cuve de mesure, ladite mesure de photoluminescence étant déduite d'un couplage de données obtenues à partir des faisceaux d'émission capturés simultanément par les éléments de capture. Selon l'invention, les systèmes optiques étant positionnés de telle manière qu'il existe un faisceau de recouvrement partiel entre le faisceau d'excitation de la source d'un premier  
20 système optique et le faisceau d'émission capté par l'élément de capture d'au moins un second système optique, au moins une lumière à la longueur d'onde de l'excitation est captée dans le faisceau de recouvrement partiel par au moins un élément de capture dit d'extinction placé au voisinage d'au moins une des sources, une mesure d'absorbance et/ou de diffraction étant déduite de données  
25 obtenues à partir de la lumière captée par l'élément de capture d'extinction.

#### Brève description des dessins

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention ressortiront de la description faite ci-dessous, en référence aux dessins annexés  
30 qui en illustrent un exemple de réalisation dépourvu de tout caractère limitatif. Sur les figures :

- la figure 1 représente un dispositif de mesure de photoluminescence tel que connu de l'art antérieur ;

- la figure 2 est un schéma de principe d'un dispositif de mesure d'une photoluminescence selon l'invention ;
- la figure 3 représente le profil de l'intensité du champ de lumière dans la direction horizontale dans la cuve de mesure d'un dispositif selon la figure 2 ;
- 5 - la figure 4 donne des exemples de caractéristiques spectrales de filtres et de lame dichroïque tels qu'implémentés dans un dispositif selon la figure 2 ;
- la figure 5 représente les spectres d'absorption, trait plein, et d'émission, trait pointillé, en fluorescence du colorant thiazole ;
- la figure 6 illustre en trois dimensions le volume analysé par un dispositif
- 10 de mesure de photoluminescence selon l'invention ;
- la figure 7 représente en perspective un premier mode de réalisation d'un dispositif de mesure d'une photoluminescence selon l'invention ;
- la figure 8 représente des moyens de correction des aberrations dues à la géométrie de la cuve de mesure ;
- 15 - la figure 9 représente le coefficient de transmission du faisceau d'émission en fonction de l'angle d'incidence sur une interface verre/air ;
- la figure 10 représente en perspective un second mode de réalisation d'un dispositif de mesure de plusieurs photoluminescences selon l'invention ;
- les figures 11a, 11b et 11c présentent plusieurs positionnements pour
- 20 un élément de capture d'extinction dans un dispositif selon l'invention ;
- les figures 12a et 12b représentent les faisceaux de recouvrement, respectivement dans une cuve triangulaire et en perspective ;
- la figure 13 explicite schématiquement le principe des mesures d'absorption et de diffraction selon l'invention ;
- 25 - la figure 14 illustre le résultat observé en sortie d'une fibre optique utilisée comme élément de capture d'extinction ;
- la figure 15 représente les spectres d'absorption, en trait plein, et d'émission, en trait pointillé, en fluorescence du colorant Phycoérythrine Cyanine
- 5 ;
- 30 - la figure 16 est un diagramme sur lequel sont portées les caractéristiques d'une population de réticulocytes mesurées grâce à un dispositif selon la figure 2.

### Description détaillée d'un mode de réalisation

La figure 2 représente schématiquement un dispositif de mesure de photoluminescence dans une cuve de mesure cylindrique CM selon l'invention. Ce dispositif comprend trois systèmes optiques Ca, Cb, Cc semblables et chacun centré sur un axe Xa, Xb, Xc. Ces axes Xa, Xb, Xc font des angles non nuls et distincts de 180° entre eux. Dans l'exemple de réalisation préférentiel présenté sur la figure 1, les systèmes optiques Ca, Cb, Cc étant répartis régulièrement autour de la cuve de mesure CM ces angles sont identiques et égaux à 120°. Ce sont des systèmes optiques dits montages en épifluorescence, dans lesquels la même optique est utilisée pour l'émission et la réception de la lumière. Dans ces montages, les axes de la lumière émise vers la cuve de mesure et de la lumière reçue en provenance de la cuve de mesure sont confondus.

Etant donné la similitude des systèmes optiques Ci, i=a, b ou c, mis en œuvre, par commodité, on ne reprendra les indices i=a, b ou c dans la description qu'aux endroits où leur utilisation est nécessaire à la compréhension. Dans les figures, seul le schéma de principe de la figure 2 présente la totalité des références indexées.

Chaque système optique Ci, comprend une source Si, pour émettre un faisceau d'excitation, schématisé en trait plein, vers la cuve de mesure CM, et un élément de capture CEi, pour capter des faisceaux d'émission de fluorescence, partiellement schématisés en trait pointillé, coaxiaux au faisceau d'excitation le long de l'axe Xi.

Dans un mode de réalisation avantageux car notamment peu coûteux, les sources Si sont des diodes électroluminescentes de forte brillance et de faible cohérence spatiale.

On sait que les diodes électroluminescentes de forte brillance sont des circuits intégrés qui comportent, sur leurs surfaces, des zones inhomogènes dues à la présence de contacts électriques servant à l'alimentation en courant de la jonction à semiconducteur. Le faisceau obtenu n'est alors pas homogène et réaliser la projection de l'image de la diode dans un volume de mesure ne permet pas de faire une discrimination précise des objets microscopiques analysés.

Ainsi, en particulier, dans le domaine des analyses biologiques, on ne peut pas obtenir d'analyseurs hématologiques donnant des résultats corrects avec un tel faisceau d'excitation d'homogénéité médiocre.

Comme illustré sur la figure 2, les diodes électroluminescentes Si sont donc avantageusement couplées avec un élément optique EO<sub>i</sub> dont la fonction est de rendre homogène le champ de lumière d'excitation. L'élément optique EO<sub>i</sub> est avantageusement un conducteur de lumière, par exemple une fibre optique, ou un élément optique spécifique comme un transformateur de faisceau optique non imageur. Par exemple, des fibres à gradient ou à saut d'indice, à section circulaire ou rectangulaire peuvent être utilisées.

Pour réaliser le couplage entre la source Si et l'élément optique EO<sub>i</sub>, la zone émissive du circuit intégré comportant la diode peut être placée sur la face d'entrée de l'élément optique conducteur de lumière EO<sub>i</sub>. Un tel couplage est économique et simple à réaliser. Comme la température du circuit intégré peut atteindre des valeurs supérieures à 100°C, il est judicieux d'utiliser des matériaux supportant de telles températures, par exemple de la silice.

Autrement, il est possible d'utiliser des conducteurs de lumière EO en plastique en insérant une optique spécifique, telle qu'une lentille boule en verre, en silice ou en rubis synthétique, entre le conducteur de lumière EO et le circuit intégré. On note d'ailleurs que la lentille boule peut encore améliorer l'homogénéité du champ de lumière d'excitation en plaçant, par exemple, le circuit intégré dans le plan focal de la lentille boule. Dans de telles conditions, le conducteur de lumière EO est éclairé en faisceau parallèle, chaque point de la source émettant une onde couplée dans la fibre.

La divergence du faisceau d'excitation en sortie d'un conducteur de lumière EO est donnée par son ouverture numérique qui, dans le cas d'une fibre optique, est une fonction de la différence d'indice entre la partie guidante et la gaine qui l'enveloppe.

Par exemple, le conducteur de lumière EO est une fibre optique en silice de diamètre 940 µm et d'ouverture numérique 0,22. La puissance couplée dans chaque fibre est de 1,5 mW soit un total de 4,5 mW dans la cuve de mesure CM. La fibre optique est placée en contact avec une diode électroluminescente de marque OSRAM (type Golden Dragon) alimentée par un courant de 2 000 mA.

Dans cet exemple, l'alimentation en courant du circuit intégré pouvant être bien au delà des données constructeur, il est judicieux de prévoir des moyens pour refroidir la jonction en particulier lorsque le faisceau d'excitation est utilisé en mode d'éclairage continu. Un circuit de refroidissement composé d'un radiateur de faible résistance thermique accolé à un élément à effet Peltier est par exemple implémenté dans un dispositif selon l'invention.

A bilan photométrique équivalent, le refroidissement peut être évité quand la source de lumière est utilisée en régime d'impulsions déclenchées par un moyen auxiliaire tel un signal d'extinction optique ou un transducteur d'impédance électrique du type de celui dit à effet Coulter.

Des mesures d'extinction ou électrique, par exemple une mesure en résistif ou impédance, sont alors effectuées en amont du dispositif de mesure de photoluminescence selon l'invention dans le sens d'écoulement du flux de fluide dans la cuve de mesure CM. Sur la figure 2, ce sens d'écoulement est perpendiculaire au plan de la figure. De cette façon, quand un convertisseur analogique-numérique des faisceaux d'émission est déclenché par une mesure du type impédance, le déclenchement des faisceaux d'excitation est avantageusement retardé du temps de parcours de l'objet microscopique détecté pour aller du capteur d'impédance au point de mesure optique situé au point de mesure M.

Ce temps est connu puisqu'il est donné par le rapport de la distance entre les deux points de mesure divisé par la vitesse  $v$  du flux de fluide qui est elle-même connue car contrôlée. Le déplacement du flux est lui même assuré par un système hydraulique auxiliaire au montage comprenant un moteur pas à pas ou un vérin pneumatique non représenté sur les figures.

Dans chaque système optique  $C_i$ , le faisceau d'excitation issu du conducteur de lumière  $EO_i$  est rendu parallèle par une optique de collimation  $L_{1i}$ . Ce faisceau d'excitation est avantageusement ensuite filtré par un élément de filtrage  $F_{1i}$  qui est un filtre passe bande défini par le ou les spectres d'absorption du ou des composés fluorescents à détecter.

Le faisceau filtré est ensuite envoyé sur un filtre dichroïque  $DC_i$ , qui est un filtre passe haut dont la fonction est de réfléchir le faisceau d'excitation en direction de la cuve de mesure CM et de transmettre les faisceaux d'émission de

fluorescence venant de la cuve de mesure CM le long de l'axe du montage en épifluorescence vers un photodétecteur PD via un filtre F2i et un élément de capture CEi. Des optiques L2i permettent ensuite d'imager la face de sortie des fibres optiques EOi dans la cuve de mesure CM.

5 La figure 3 représente un profil normalisé de l'intensité IL du champ de lumière centré au point M dans la direction horizontale tel qu'obtenu dans la cuve de mesure CM. On observe une bonne homogénéité spatiale sur la largeur du point M qui est, là, de 300  $\mu\text{m}$ . Cela est notamment dû à l'utilisation de faisceaux d'excitation à grande ouverture numérique.

10 La figure 4 décrit un exemple de caractéristiques spectrales, en l'occurrence des gains G en fonction de la longueur d'onde, pour les filtres F1 et F2 et pour la lame dichroïque DC dans une application destinée à la mesure d'objets microscopiques colorés au moyen du colorant thiazole orange ou tout  
15 autre colorant ayant les mêmes caractéristiques spectrométriques. Un tel colorant, dont les propriétés d'absorption, en trait plein, et de fluorescence, en trait pointillé, sont représentées sur la figure 5, est par exemple utilisé pour le comptage différentiel des réticulocytes qui est une des applications majeures de l'invention. Il est également possible de détecter avec l'invention des cellules  
nucléées ou d'autres éléments biologiques. Ainsi que schématisé sur la figure 5,  
20 l'excitation est réalisée dans une bande étroite centrée sur 488 nm et la mesure de fluorescence est réalisée sur une bande de 30 nm centrée sur 530 nm.

Ainsi, sur la figure 4, le filtre F1 est centré à la longueur d'onde d'excitation de 470 nm avec une largeur de 15 nm, le filtre F2 est centré à la  
25 longueur d'onde d'émission de fluorescence de 540 nm avec une largeur de 20 nm. Le filtre F2 est mono canal. Cependant lorsque l'on souhaite mesurer plusieurs fluorescences, un filtre multi canaux est avantageusement utilisé. Le filtre dichroïque DC a un front de montée très rapide passant de sa transmission minimale à sa transmission maximale sur 10 nm environ. C'est un filtre passe  
haut laissant passer les longueurs d'onde d'émission de fluorescence et  
30 réfléchissant les longueurs d'onde d'excitation. De tels filtres sont par exemple disponibles chez les fabricants OMEGA ou SEMROCK.

Par ailleurs, il est connu que plus la puissance lumineuse envoyée dans la cuve de mesure CM est importante, plus les phénomènes fluorescents vont être

importants. Le grandissement  $Gr$  de l'ensemble optique constitué par les combinaisons optiques L1 et L2 est alors un paramètre déterminant de cette puissance.

5 En effet, avec un conducteur de lumière EO de section rectangulaire ( $a \times b$ ), l'image projetée dans la chambre de comptage présente une taille de  $(a/Gr) \times (b/Gr)$ . En notant  $P$  la puissance optique lumineuse dans un conducteur de lumière unique, la densité de puissance au niveau de la face de sortie du conducteur de lumière EO est alors  $P/(a \times b)$ .

10 Au niveau de l'image, la focalisation du faisceau d'excitation produit une densité de puissance égale à  $P Gr^2 / (a \times b)$ , c'est à dire que la densité de puissance est  $Gr^2$  fois plus importante qu'au niveau de la face de sortie du conducteur de lumière EO.

15 On aura donc intérêt à ce que le grandissement  $Gr$  soit le plus grand possible et il est donc avantageux que les combinaisons optiques L2 présentent de grandes ouvertures numériques.

Avec le dispositif de la figure 2, basé sur l'utilisation de trois systèmes optiques placées à 120 degrés l'un de l'autre, chaque objet microscopique du volume de mesure perçoit trois faisceaux d'excitation, bénéficiant ainsi d'une triple excitation des fluorochromes.

20 En considérant une excitation du volume de mesure par un seul faisceau d'excitation, les lumières de fluorescence étant isotropes, des faisceaux d'émission de fluorescence sont collectés par les trois combinaisons optiques L2a, L2b, L2c. Dans chaque système optique  $C_i$ , le faisceau d'émission est alors transmis au travers de la lame dichroïque  $DC_i$  puis filtré à l'aide du filtre  $F2_i$ . Le  
25 faisceau d'émission est alors focalisé à l'aide de la combinaison optique  $L3_i$  vers l'élément de capture  $CE_i$ .

30 Les éléments de capture  $CE_a$ ,  $CE_b$ ,  $CE_c$  sont avantageusement des conducteurs de lumière, par exemple des fibres optiques, dont une extrémité est placée au centre focal des lentilles  $L3_a$ ,  $L3_b$ ,  $L3_c$  et l'autre extrémité est orientée vers une surface sensible d'un photodétecteur unique PD, qui peut être un photomultiplicateur, une photodiode simple ou à effet d'avalanche.

Le photodétecteur PD reçoit simultanément les faisceaux d'émission en provenance des trois éléments de capture CEa, CEb et CEc et réalise alors la somme des énergies lumineuses captées par les fibres optiques CEa, CEb, CEc.

Puisque le dispositif selon l'invention permet de disposer de trois  
5 faisceaux d'excitation simultanés, ce raisonnement s'applique sur chaque faisceau d'excitation. Finalement, le gain en sensibilité par rapport à un montage de l'art antérieur comme celui représenté sur la figure 1 est donc de  $(3^2)=9$ .

La quantité de lumière collectée par cet ensemble est donc plus importante que la somme des quantités lumineuses collectée par chaque  
10 système prises séparément, et ce dès que deux systèmes optiques sont utilisés selon les principes de l'invention.

En outre, comme dans tous les dispositifs selon l'invention, les faisceaux d'excitation dans le dispositif selon la figure 2 sont désaxés l'un par rapport à l'autre car les montages en épifluorescence font un angle obtus non nul et  
15 distinct de  $180^\circ$ . Cette configuration évite un recouvrement total des faisceaux d'excitation et d'émission ce qui minimise la lumière de fond de scène, principale source de bruit au niveau du photodétecteur PD.

En considérant l'utilisation d'une cuve de section carrée avec quatre systèmes optiques se faisant face de part et d'autre de la cuve de mesure, on  
20 dispose de quatre faces opposées pour illuminer l'objet microscopique à analyser et, donc, stimuler la fluorescence. Cependant, cette configuration n'est pas favorable car il existe un recouvrement de 100 % entre les faisceaux d'excitation et d'émission, avec pour conséquence immédiate un taux de lumière parasite plus important que dans un dispositif selon l'invention. Une telle lumière parasite  
25 induit une composante continue  $I_b$  et un bruit photoélectrique aléatoire caractérisé par une variance  $\sigma^2 = 2 q I_b B$  où  $q$  est la charge de l'électron et  $B$  est la bande passante du circuit de réception.

On note que plus  $I_b$  est petit, plus le dispositif de mesure sera discriminant. Or,  $I_b$  est minimisé dans les dispositifs selon l'invention car les  
30 faisceaux d'excitation ne se recouvrent pas ou ne se recouvre que partiellement.

Avantageusement, le dispositif de la figure 2 comporte en outre des filtres spatiaux D, par exemple de simples trous d'épingle, placés au devant des éléments de capture CE. Ce filtrage a pour effet d'éliminer certains signaux

indésirables, comme par exemple des réflexions parasites sur les parois de la cuve de mesure CM. Il contribue ainsi à la diminution de la composante  $I_b$  et donc à l'amélioration du rapport signal sur bruit.

Un tel filtrage spatial a aussi pour fonction de réduire le volume de mesure  $v$  centré en M, lequel est défini par l'intersection des faisceaux d'excitation. La figure 6 présente un tel volume de mesure  $v$  dans le cas de conducteurs de lumière OE circulaires. Ce volume  $v$  correspond à l'ensemble des intersections des trois faisceaux d'excitation placés à  $120^\circ$  selon le principe présenté sur la figure 2.

La figure 7 représente, en perspective, un premier mode de réalisation d'un dispositif selon l'invention dans lequel est utilisée une cuve de mesure CM triangulaire. La cuve de mesure CM est alors telle que ses faces sont perpendiculaires aux axes  $X_a$ ,  $X_b$ ,  $X_c$  des systèmes optiques  $C_a$ ,  $C_b$  et  $C_c$  situés à  $120^\circ$  les uns des autres.

Dans chaque système  $C_i$ , une lame dichroïque DC est placée à  $45^\circ$  à l'intersection des faisceaux d'excitation et d'émission et présente les caractéristiques de transmission spectrale présentée sur la figure 4.

Le mode de réalisation présenté sur la figure 7 est adapté à la détection et au comptage d'une unique longueur d'onde de fluorescence et utilise trois systèmes optiques  $C_a$ ,  $C_b$  et  $C_c$  selon les principes de l'invention. Ce dispositif peut être utilisé notamment pour la détection et le comptage de réticulocytes dans des échantillons de sang total périphérique. Sur cette figure, le passage d'objets microscopiques dans le plan d'illumination des systèmes optiques est figuré par une succession de billes alignées traversant la cuve de mesure CM.

Dans ce mode de réalisation, les trois faisceaux d'émission sont captés par trois éléments de capture  $CE_a$ ,  $CE_b$ ,  $CE_c$ , qui sont des conducteurs de lumière conjugués sur un seul photodétecteur PD. Chaque faisceau d'émission est filtré spectralement au moyen d'une lame dichroïque DC et de filtres interférentiels, non représentés et préférentiellement positionnés entre les lames dichroïques DC et les combinaisons optiques L3.

Dans une variante, le filtrage spectral est assuré par un filtre interférentiel positionné entre les trois arrivées des éléments de capture  $CE_a$ ,  $CE_b$ ,  $CE_c$  et le détecteur photosensible PD.

Dans ce mode de réalisation où la cuve de mesure est triangulaire, il est avantageux que chaque système optique Ca, Cb, Cc comprenne des moyens de corrections des aberrations optiques introduites par le dioptre épais constitué par chaque face de la cuve de mesure CM. Ainsi, la combinaison optique L2 est  
5 avantageusement corrigée des aberrations géométriques liées d'une part à la grande ouverture numérique du faisceau qui peut être supérieure à 0,6, et d'autre part à la traversée de dioptres épais, notamment le dioptre de la cuve de mesure CM et l'épaisseur de fluide traversé jusqu'au point de mesure M.

On sait en effet que divers types d'aberrations, appelées aberrations  
10 géométriques, sont responsables d'une diminution de la densité de puissance au point de mesure M. L'aberration sphérique ou aberration de sphéricité est la principale aberration qui doit être ici corrigée. La géométrie de la cuve de mesure CM étant fixée, plusieurs solutions peuvent être mises en œuvre pour la correction de l'aberration de sphéricité selon les connaissances de l'homme du  
15 métier.

La figure 8 montre un exemple de réalisation d'une correction mettant en œuvre un train de lentilles de cambrures et d'indices de réfraction choisis, l'intervalle entre deux lentilles étant aussi un paramètre dimensionnant.

Sur cette figure 8, la correction est réalisée pour une cuve de mesure CM  
20 de section triangulaire équilatérale. Elle est une association de trois dioptres plans par exemple composés d'une paroi en verre de 2,5 mm et de 1,5 mm de silice.

Ainsi, dans l'exemple proposé sur la figure 7, la combinaison optique L1 est un doublet achromatique qui minimise l'aberration de chromatisme à 488 nm,  
25 la combinaison optique L2 est composé d'un train de quatre lentilles composé d'un doublet accolé incluant les dioptres de la figure 8. Enfin, la combinaison optique L3 est une lentille plan convexe.

On note que des optiques asphériques peuvent également être utilisées pour réaliser des corrections d'aberrations semblables ou d'autres sortes.

Les optiques décrites corrigent les aberrations géométriques et chromatiques introduites par la traversée des dioptries épais constitués par la paroi de verre de la cuve et l'épaisseur d'eau comprise entre la paroi de la cuve de mesure CM et le passage des objets microscopiques, par exemple les cellules,  
5 au point M.

Le faisceau d'excitation traverse alors une première interface air/verre puis une seconde interface verre/eau qui réduisent la quantité de lumière d'un facteur égal à la transmission de Fresnel aux interfaces considérées.

Un traitement multi diélectrique peut être utilisé pour minimiser la  
10 réflexion de la lumière aux interfaces considérées. La figure 9 présente le coefficient de transmission du faisceau d'émission en fonction de l'angle d'incidence sur l'interface matériau-air en fonction de l'angle d'incidence pour un indice de matériau de  $n = 1,46$  à la longueur d'onde de 488 nm.

On constate que le phénomène de réflexion totale limite l'ouverture  
15 numérique du faisceau d'émission. Si  $n$  est l'indice de réfraction de la paroi transparente de la cuve de mesure, l'angle de réflexion limite l'angle géométrique à la valeur  $\theta$  tel que  $\sin \theta = 1/n$ . On remarque donc ici que l'utilisation d'une cuve de mesure cylindrique ou sphérique, comme schématisée sur la figure 2, permet de limiter les aberrations introduites par la géométrie de la cuve de  
20 mesure CM.

On note en outre que l'ensemble optique constitué des combinaisons optiques L1 et L2 peut être optimisé en corrigeant, en plus des aberrations géométriques, l'aberration de chromatisme liée à la largeur du spectre de l'excitation.

25 En outre l'ensemble optique constitué des combinaisons optiques L2 et L3 peut être optimisé en corrigeant le chromatisme lié, d'une part, au fait que les lumières de fluorescence sont centrées sur des longueurs d'onde décalées vers les hautes longueurs d'onde, et d'autre part au fait que la détection de ces lumières est réalisée sur une bande spectrale de largeur finie.

30 Il est ainsi utile d'optimiser les caractéristiques optiques des chemins des faisceaux d'excitation et d'émission en limitant, par exemple, les aberrations calculées sur l'axe et en bord de champ à moins de  $\pm 20 \mu\text{m}$  aux trois longueurs d'onde de base :  $0,460 \mu\text{m}$  (bleu)  $0,500 \mu\text{m}$  (vert) et  $0,600 \mu\text{m}$  (rouge).

Dans le dispositif de la figure 7, les faisceaux d'émission de fluorescence sont collectées par les trois éléments de capture CEa, CEb et CEc, qui sont des conducteurs de lumière rassemblés en un faisceau unique couplé à un détecteur photoélectrique PD, qui peut être un photomultiplicateur ou encore une photodiode à avalanche.

Ce photodétecteur PD réalise la somme des énergies lumineuses recueillies en provenance des trois fibres optiques. Un calcul de la fluorescence est alors effectué selon les connaissances de l'homme du métier, notamment après un étalonnage préalable du dispositif. Une mesure de la fluorescence générée dans le volume de mesure  $v$  est donc obtenue.

La figure 10 représente, en perspective, un second mode de réalisation d'un dispositif selon l'invention adapté aux mesures de plusieurs longueurs d'onde de fluorescence d'un fluide dans une cuve de mesure CM.

Les objets microscopiques présents dans la cuve de mesure CM sont, ici encore, illuminés par les trois faisceaux d'excitation provenant des sources  $S_i$  de trois systèmes Ca, Cb, Cc, via un filtrage au moyen d'un éventuel filtre spectral, non représenté et une lame séparatrice dichroïque DC. Dans chaque système optique  $C_i$ , la lame dichroïque  $DC_i$  réfléchit la lumière issue de  $S_i$  vers la cuve de mesure CM où  $L_2$  la concentre. Cette lame dichroïque  $DC_i$  transmet en revanche les longueurs d'onde supérieures provenant des objets microscopiques illuminés, vers les éléments de capture CEa, CEb et CEc qui sont préférentiellement des conducteurs de lumière comme des fibres optiques.

Les trois éléments de capture CEa, CEb, CEc sont ensuite conjugués sur un ensemble de détection spectrométrique commun constitué, par exemple, d'un réseau de diffraction DG et de  $n$  photo détecteurs PD1 à PDn. Les  $n$  photodétecteurs sont positionnés spatialement par rapport au réseau DG pour recueillir et mesurer chacun une bande de longueurs d'onde correspondante chacune à une des fluorescences cibles émises par les éléments biologiques passant dans la cuve CM. Ces photodétecteurs PD1 à PDn peuvent être des détecteurs choisis parmi les photo diodes éventuellement à effet d'avalanche, par exemple agencées en ligne ou en barrette, les tubes photo multiplicateurs, les capteurs optiques multiples de type CCD par exemple organisés en matrice ou en ligne.

Des intensités de fluorescence distinctes sont alors obtenues pour une pluralité de bandes de longueur d'onde distinctes. La présence de fluorescences à des longueurs d'ondes distinctes peut être due à des différences entre les particules détectées ou à la pluralité de longueur d'ondes utilisées lors de l'émission, cette pluralité engendrant des fluorescences à des longueurs d'ondes distinctes.

Un des avantages de cet ensemble de détection spectrométrique particulier est l'adaptabilité en longueurs d'onde de fluorescence, le dispositif pouvant être aisément utilisé pour détecter des particules de caractéristiques distinctes sans modification. En outre, le positionnement de chaque photodétecteur conditionne autant la longueur d'onde cible que la largeur de bande de la détection.

Dans une variante, les trois éléments de capture CEa, CEb, CEc sont conjugués sur un ensemble de détection constitué, par exemple, de lames séparatrices, éventuellement dichroïques répartissant le faisceau lumineux vers des photodétecteurs PD1 à PDn.

Préalablement à la mesure, les faisceaux d'émission peuvent être filtrés au moyen de filtres interférentiels adaptés aux fluorophores utilisés.

Selon le mode de réalisation préférentiel de l'invention, au moins un des systèmes optiques, par exemple Ca sur la figure 2, inclut un élément de capture dit d'extinction DT placé à proximité de la source, ici Sa, du système concerné Ca. Cet élément de capture d'extinction DT est destiné à capter des lumières ayant les mêmes propriétés en terme de longueurs d'onde que la source Sa. Ces lumières sont donc réfléchies par la lame dichroïque DC en provenance de la cuve CM vers la source Sa. L'élément de capture d'extinction DT est couplé à un photodétecteur PDT.

La figure 11 propose un certain nombre de positionnements possibles pour un élément de capture d'extinction DTa à proximité de la source Sa, figurée par la section de l'élément optique EOa assurant l'homogénéité du faisceau produit par la source Sa.

Un tel élément de capture d'extinction DT permet de visualiser les intersections des faisceaux d'excitation et d'émission, encore appelées faisceaux de recouvrement.

Sur le plan géométrique, ces intersections correspondent à l'intersection de six cônes s'appuyant sur la pupille des optiques  $L2_i$  et pointant au centre de la chambre de mesure CM : ces volumes ou faisceaux de recouvrement FC sont représentés à la figure 12. Ils existent dès que l'ouverture numérique de la

5 lentille L2 est suffisamment importante.

La figure 12a représente une coupe horizontale de la cuve de mesure CM sur laquelle sont indiqués les axes  $X_a$ ,  $X_b$  et  $X_c$  des trois systèmes optiques  $C_a$ ,  $C_b$  et  $C_c$ . Les faisceaux de recouvrement correspondant respectivement à l'excitation par le faisceau d'excitation du système optique  $C_b$  et  $C_c$  reçu par le

10 système  $C_a$  sont notés  $FC_{b_a}$  et  $FC_{c_a}$ . Cette notation est utilisée pour les autres faisceaux de recouvrement reçus par les systèmes  $C_b$  et  $C_c$ .

La figure 12b donne une représentation en trois dimensions de ces mêmes faisceaux de recouvrement.

L'existence de tels faisceaux de recouvrement est avantageusement exploitée pour faire une mesure de l'absorption et de la diffraction par les objets

15 microscopiques présents dans la cuve de mesure. Les éléments de capture d'extinction DT sont destinés à capter la lumière de ces faisceaux.

Selon la figure 11a, la section de l'élément optique  $EO_a$  est rectangulaire et inscrite dans un carré dont la partie supérieure est exploitée pour placer une

20 pluralité d'éléments de capture d'extinction  $DT_a'$ , pour recevoir des signaux révélateurs d'une absorption, et  $DT_a''$ , pour recevoir des signaux révélateurs d'une diffraction. En effet, l'utilisation de deux capteurs d'extinction rectangulaires  $DT_a'$  placés de part et d'autre de la source  $S_a$  permet de capter les lumières des faisceaux de recouvrement puisque la géométrie de ces faisceaux

25 est telle qu'ils sont localisés de part et d'autre du faisceau d'excitation. L'utilisation du capteur d'extinction central  $DT_a''$  permet quant à lui de capter les lumières diffractés éventuelles. On note que, dans cet exemple, les sections des autres éléments optiques  $EO_b$ ,  $EO_c$  pourront avantageusement être, quant à elles, carrées.

Les figures 11b et 11c décrivent deux autres positionnements d'un seul

30 élément de capture  $DT_a$  de section circulaire par rapport à la source  $S_a$  figurée par la section de l'élément optique  $EO_a$ .

La figure 13 explicite schématiquement le principe d'une mesure d'absorption et/ou de diffraction dans un dispositif de mesure de photoluminescence selon la figure 7. Pour l'explication, on considère que la cuve de mesure CM est éclairée par deux faisceaux d'excitation provenant des systèmes optiques Cb et Cc.

L'ouverture des faisceaux d'excitation en provenance des sources Sb et Sc est telle que des faisceaux de recouvrement  $FCb_a$  et  $FCc_a$  existent avec le faisceau d'émission du système Ca.

Le faisceau d'émission de la longueur d'onde de la fluorescence capté par le système Ca, non représenté, traverse la lame DCa sans être dévié alors que la lumière reçue en provenance des sources Sb et Sc constituant les faisceaux de recouvrement est déviée par la lame dichroïque DCa. Sur la figure 13, seuls ces faisceaux lumineux de recouvrement  $FCb_a$  et  $FCc_a$  de même longueur d'onde que les sources Sb et Sc sont représentés. Ils proviennent de la cuve de mesure CM et vont vers l'élément de capture d'extinction DTa via la lame dichroïque DCa. L'élément de capture d'extinction DTa est avantageusement une fibre optique de section circulaire.

En réalité, il existe deux types de faisceaux lumineux de même longueur d'onde que les sources Sb et Sc arrivant sur le ou les éléments de capture d'extinction DTa : ceux qui appartiennent à un faisceau de recouvrement  $FCb_a$  ou  $FCc_a$  et ceux qui n'y appartiennent pas.

Ceux qui n'appartiennent à aucun faisceau de recouvrement  $FC_a$  n'incluent que des rayons diffractés RD dans la cuve de mesure CM et sont révélateurs de la diffraction dans la cuve de mesure CM. Des rayons RD n'apparaîtront donc dans le secteur angulaire bordé par les faisceaux de recouvrement  $FCb_a$  et  $FCc_a$  que lorsqu'un objet microscopique aura diffracté la lumière d'excitation dans la cuve de mesure CM.

Ceux qui appartiennent à un faisceau de recouvrement  $FC_a$ , par exemple celui  $FCc_a$  de la source Sc, incluent des rayons diffractés en provenance d'une des sources Sb, Sc, voire même Sa quand cette dernière est active, et les rayons du faisceau de recouvrement en provenance de la source Sc et ayant traversé la cuve de mesure CM sans déviation ni absorption.

En conséquence, les rayons d'un faisceau de recouvrement sont révélateurs partiellement de la diffraction mais aussi de l'absorption puisqu'une extinction due à un objet microscopique absorbant sera visible dans les secteurs angulaires définis par un faisceau de recouvrement.

5 Un des avantages de l'invention est la possibilité de visualiser et d'exploiter les faisceaux de recouvrement FC et les rayons diffractés RD dans le secteur angulaire bordé par les faisceaux de recouvrement FC.

Selon une caractéristique particulièrement avantageuse de l'invention, une fibre optique préférentiellement de section circulaire est utilisée pour réaliser  
10 l'élément de capture d'extinction DTa, lorsque celui-ci est unique. Les caractéristiques optiques d'une telle fibre optique permettent en effet d'exploiter les différences d'angles d'entrée dans la fibre optique des rayons appartenant et n'appartenant pas à un faisceau de recouvrement FCb<sub>a</sub> ou FCc<sub>a</sub>. En effet, comme illustré sur la figure 13, les rayons des faisceaux de recouvrement FCb<sub>a</sub> et FCc<sub>a</sub>  
15 entrent dans la fibre avec un angle plus grand par rapport à l'axe de la fibre que ceux RD, diffractés, situés dans le secteur angulaire bordé par les faisceaux de recouvrement. Cette propriété angulaire est conservée le long de la fibre car les rayons des faisceaux de recouvrement vrillent le long de la fibre mais restent à proximité de la ligne de saut d'indice ou de gradient d'indice alors que les autres  
20 rayons diffractés entrés avec un angle plus petit par rapport à l'axe de la fibre se retrouvent dans toute la section de la fibre.

Aussi, comme illustré sur la section de fibre optique de la figure 14, en imageant la sortie de la fibre DTa sur un photodétecteur PDT multiélément, chaque élément visant une partie spécifique de la section de la fibre DTa, on  
25 constate que le contour CNT de la fibre DTa est lumineuse en permanence et subit une extinction au moment du passage d'un objet microscopique, cette extinction étant due à l'absorption par cet objet. La lumière alors observée sur le contour CNT est révélatrice de l'absorption et partiellement de la diffraction qui n'a pas de raison d'être nulle dans les secteurs angulaires des faisceaux de  
30 recouvrement.

On constate aussi que le centre CTR de la fibre DTa ne s'éclaire qu'au passage d'un objet microscopique, signant la diffraction de la lumière par cet objet. En considérant que la diffraction est isotrope, il est possible, en connectant

le photodétecteur PDT à des moyens de traitement, de déduire son intensité à la lumière observée sur le contour de la fibre optique afin d'obtenir une valeur de l'absorption.

5 Dans le cas où plusieurs éléments de capture d'extinction sont utilisés par exemple selon la configuration de la figure 11a, c'est la présence et l'intensité d'une lumière en sortie des capteurs DTa' qui détermine les mesures d'absorption et la présence et l'intensité d'une lumière en sortie du capteur DTa'' qui détermine les mesures de diffraction.

10 Une telle utilisation des faisceaux de recouvrement est particulièrement intéressante pour différencier des cellules biologiques en fonction de leurs caractéristiques d'absorption et/ou de diffraction. En particulier, de telles mesures d'extinction peuvent servir à l'étude cytologique pour laquelle elles s'interprètent comme des informations morphologiques ou chimiques.

15 Afin de mieux maîtriser l'isotropie de la diffraction il pourra être utile de rendre les cellules les plus sphériques possibles en utilisant des agents chimiques.

20 Les exemples de dispositifs selon l'invention décrits permettent donc la mesure de photoluminescences cellulaires sensibles dans la mesure où chaque objet microscopique, par exemple biologique traversant la cuve de mesure CM, reçoit la conjugaison de trois faisceaux lumineux de même longueur d'onde et la lumière réémise par fluorescence est mesurée par un procédé utilisant des montages en épifluorescence, les trois épifluorescences étant conjuguées dans un seul et même photodétecteur pour chaque longueur d'onde de fluorescence considérée.

25 Dans la suite est donné une procédure de différenciation et de comptage d'éléments biologiques notamment marqués au moyen d'anticorps ou autres composés fluorescents à l'aide de mesure de photoluminescence selon l'invention.

30 Comme évoqué auparavant, l'identification et le comptage différentiel d'éléments biologiques se fait couramment en cytométrie de flux. Pour ce faire l'échantillon de sang est incubé avec des anticorps spécifiques des éléments biologiques à identifier. Ces anticorps sont conjugués à des marqueurs, le plus souvent des fluorochromes. Ces fluorochromes sont généralement choisis pour

identifier chaque anticorps spécifiquement et la mesure d'un fluorochrome correspond donc à l'identification de l'anticorps sur lequel il est conjugué. Il est ainsi possible d'identifier plusieurs anticorps différents en mesurant autant de longueurs d'ondes différentes.

5 Dans le dispositif décrit sur la figure 10, il est possible de mesurer plusieurs longueurs d'onde différentes. Il est ainsi possible de mesurer au moins autant d'anticorps ou de marquages spécifiques que de longueurs d'onde.

Il existe une très grande quantité d'applications de ces principes. Il est décrit ici un principe générique pouvant s'adapter à tout marquage de cytométrie  
10 de flux.

Le spectre de la figure 5, déjà présentée, est celui du thiazole orange. Il peut également s'appliquer au colorant Fluorescéine Iso ThyoCyanate (FITC) très couramment utilisé en conjugaison à un anticorps.

La figure 15 décrit un autre colorant, le tandem Phycoérythrine Cyanine  
15 5, également couramment utilisé en cytométrie de flux. Ces deux colorants peuvent être utilisés pour identifier au moins deux anticorps différents dans le dispositif décrit.

Afin d'effectuer l'analyse des éléments biologiques avec un dispositif tel que décrit sur l'une des figures 7 et 10, les étapes suivantes doivent être effectuées :  
20

- Mélange d'une aliquote de sang total, par exemple 50 mm<sup>3</sup>, avec les anticorps conjugués spécifiques des éléments biologiques ciblés.
- Incubation de la solution à l'abri de la lumière, par exemple 20 min, le temps nécessaire au complet marquage des éléments biologiques et ainsi à la coloration des substances intra cellulaires.  
25
- Injection de la solution d'éléments biologiques ainsi obtenue dans la cuve de mesure CM de telle manière que les éléments biologiques passent successivement et unitairement au centre M de la cuve CM afin d'interagir avec la lumière illuminant cette zone. Avantageusement la cuve CM est agencée de manière à mesurer séquentiellement sur tous les éléments la  
30 traversant, leur volume par la méthode d'impédancemétrie tel que décrit dans le brevet FR 2,653,885.

- Mesures successives et pour chaque élément biologique traversant la cuve CM de son volume par impédancemétrie et de sa fluorescence.

Les mesures peuvent être réalisées sur une seule longueur d'onde ou sur une pluralité en fonction du dispositif utilisé et des marqueurs utilisés.

5 Les étapes précédemment présentées ont été effectuées pour la différenciation et le comptage de réticulocytes avec le dispositif de la figure 7. Les réticulocytes sont des formes jeunes des érythrocytes ou globules rouges. Ils sont caractérisés par la présence intracytoplasmique de réticulums constitués d'ARN. Ces traces sont le restant de l'expulsion du noyau lors de son passage du  
10 stade érythroblaste au stade réticulocyte au sein de la moelle osseuse. Environ vingt quatre heures après cette expulsion, les réticulocytes passent de la moelle osseuse dans le sang. Dans le sang périphérique où leur présence n'excède pas quarante huit heures, les ribosomes se dégradent pour transformer le réticulocyte en érythrocyte mature.

15 La durée de vie moyenne d'un globule rouge étant de 120 jours, le taux de régénération normal doit donc être de 0,83 %. Le pourcentage moyen normal généralement accepté est entre 0,5 et 1,5 %, ces valeurs étant plus élevées chez le nourrisson de moins de 3 semaines (de 2 à 6%). L'observation et la  
20 numération des réticulocytes est donc un indicateur de l'activité érythropoïétique et ainsi un paramètre particulièrement utile notamment dans le suivi de la reprise médullaire après une chimiothérapie, dans le suivi de traitement par érythropoïétine recombinante (rHuEpo), dans le bilan exploratoire d'une anémie ou encore dans la recherche d'une hémolyse ou hémorragie compensée.

25 Pour la mesure de la fluorescence des réticulocytes, l'étape de dilution de l'échantillon de sang total est réalisée à l'aide d'un réactif contenant du Thiazole Orange, notamment tel que décrit dans le brevet FR 2,759,166.

Les résultats des mesures de fluorescence et de volume sont reconstitués et avantageusement agencés pour permettre le comptage absolu et différentiel des éléments biologiques observés.

30 Il est alors possible d'extraire le nombre d'érythrocytes et le nombre et pourcentage de réticulocytes sur la base de la fluorescence de l'ARN intracellulaire.

Il est aussi possible de calculer un index d'immaturité des réticulocytes (IRF) sur la base de la répartition des éléments en fonction de leur fluorescence. Les éléments les plus fluorescents étant considérés comme les plus jeunes.

5 La figure 16 est un diagramme sur lequel sont portées les résultats obtenus grâce à l'invention : la population de réticulocytes est placée sur le diagramme en fonction de leur volume cellulaire VC en  $\mu\text{m}^3$  mesuré par impédancemétrie en abscisses et en ordonnées, l'intensité IF du signal de fluorescence picoWatts.

10 Dans l'esprit de l'invention, plusieurs variantes et mises en œuvres apparaîtront évidentes à l'homme du métier.

Bien que décrite dans une configuration particulièrement avantageuse avec trois systèmes optiques, l'invention peut être mise en œuvre avec des nombres variés de systèmes optiques, à partir de deux et décalées par paires d'un angle non nul et distinct de  $180^\circ$ . En particulier, avec de telles caractéristiques selon l'invention, il est possible d'exploiter les faisceaux de recouvrement ainsi que décrit et revendiqué. Outre les propriétés de fluorescence également mesurées, une telle propriété est très utile pour discriminer des objets microscopiques distincts.

20 On constate que dans le cas où le nombre de systèmes excède trois, il est nécessaire qu'au moins deux systèmes optiques fassent un angle non obtus, l'invention nécessitant néanmoins qu'au moins une paire de systèmes optiques fassent entre eux un angle obtus, indépendamment des autres systèmes optiques. Une telle caractéristique est en particulier nécessaire pour observer un faisceau de recouvrement et donc mettre en œuvre une mesure d'absorption et/ou de diffraction selon l'invention.

25 Pour certaines applications particulières, il peut aussi être envisagé de varier les longueurs d'onde des sources Sa, Sb, Sc. Il serait ainsi possible d'illuminer les objets microscopiques traversant la cuve de mesure CM avec un faisceau d'excitation comportant deux ou plusieurs gammes de longueurs d'onde ou avec des faisceaux d'excitation de longueurs d'ondes distinctes et de mesurer  
30 individuellement les épifluorescences en résultant.

Il peut aussi être envisagé de séparer les éléments de capture CEa, CEb, CEc afin de, soit les conjuguer par deux, soit les connecter individuellement

chacun sur un photodétecteur adapté. En outre, il est possible d'utiliser divers autres moyens de détection lumineuse dans un dispositif selon l'invention.

## REVENDICATIONS

1. Dispositif pour une mesure de photoluminescence et une mesure d'absorbance et/ou de diffraction dans un fluide présent dans une cuve de mesure [CM] comprenant au moins deux systèmes optiques [Ci, i=a,b,c] incluant  
5 chacun une source [Si] de lumière de faible cohérence spatiale envoyant un faisceau d'excitation vers la cuve de mesure [CM] selon un axe [Xi] dit du système [Ci] et un élément de capture [CEi] d'un faisceau d'émission de photoluminescence centré sur l'axe du système [Xi], lesdits systèmes optiques  
10 [Ci] fonctionnant simultanément et étant positionnés pour que leurs axes [Xi] fassent entre eux un angle obtus non nul et distinct de 180° autour de la cuve de mesure [CM], ladite mesure de photoluminescence étant déduite d'un couplage de données obtenues à partir des faisceaux d'émission capturés simultanément par les éléments de capture [CEi], les systèmes optiques [Ci] étant en outre  
15 positionnés de telle manière qu'il existe au moins un faisceau de recouvrement partiel [FCb<sub>a</sub>] entre le faisceau d'excitation de la source [Sb] d'un premier système optique [Cb] et le faisceau d'émission capté par l'élément de capture [CEa] d'un second système optique [Ca], le dispositif est en outre muni d'au moins un élément de capture [DTa] dit d'extinction au voisinage d'au moins une  
20 des sources [Sa] pour capter une lumière à la longueur d'onde de l'excitation dans le faisceau de recouvrement partiel [FCb<sub>a</sub>], une mesure d'absorbance et/ou de diffraction étant déduite de données obtenues à partir de la lumière captée par l'élément de capture d'extinction [DTa].

25 2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend un nombre impair de systèmes optiques [Ci] positionnés pour que, par paire, leurs axes [Xi] fassent entre eux des angles obtus non nuls et distincts de 180° autour de la cuve de mesure [CM].

30 3. Dispositif selon la revendication 2, caractérisé en ce que les systèmes optiques [Ci] sont positionnés pour que leurs axes [Xi] fassent entre eux des angles identiques autour de la cuve de mesure [CM].

4. Dispositif selon l'une des revendications 2 et 3, caractérisé en ce qu'il comprend trois systèmes optiques [Ci] positionnés autour de la cuve de mesure [CM] de telle manière que leurs axes [Xi] fassent entre eux des angles identiques autour de la cuve de mesure [CM].
- 5
5. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les éléments de capture [CEi] du faisceau d'émission sont reliés à un même photodétecteur [PD] ou à un même ensemble de photodétecteurs [PD1, PDn].
- 10
6. Dispositif selon la revendication 5, caractérisé en ce que le ou les photodétecteurs [PD] est(sont) relié(s) à des moyens de traitement de données aptes à déduire la mesure de photoluminescence à partir des données reçues en provenance du ou des photodétecteurs [PD].
- 15
7. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'élément de capture d'extinction [DTa] est relié à un photodétecteur [PDT], lui-même relié à des moyens de traitement de données aptes à déduire une mesure d'absorbance et/ou de diffraction à partir des données reçues en provenance du photodétecteur [PDT].
- 20
8. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les éléments de capture des faisceaux d'émission [CEi] et/ou d'extinction [DT] sont des fibres optiques de section circulaire ou rectangulaire.
- 25
9. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les sources de lumière [Si] incluent une diode électroluminescente de faible cohérence spatiale couplée à un élément optique [EOi] destiné à rendre homogène le faisceau d'excitation.
- 30
10. Dispositif selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'élément optique [EOi] est un conducteur de lumière.

11. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la cuve de mesure [CM] a une section polyédrique dans le plan où sont placés les systèmes optiques [Ci], le polyèdre étant tel que ses faces soient perpendiculaires aux axes des systèmes optiques [Ci].

5

12. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la cuve de mesure [CM] est cylindrique.

13. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que chaque système optique [Ci] inclut des moyens de correction d'aberration pour corriger les aberrations introduites par la géométrie de la cuve de mesure [CM] sur les différents faisceaux.

10

14. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide est un fluide biologique.

15

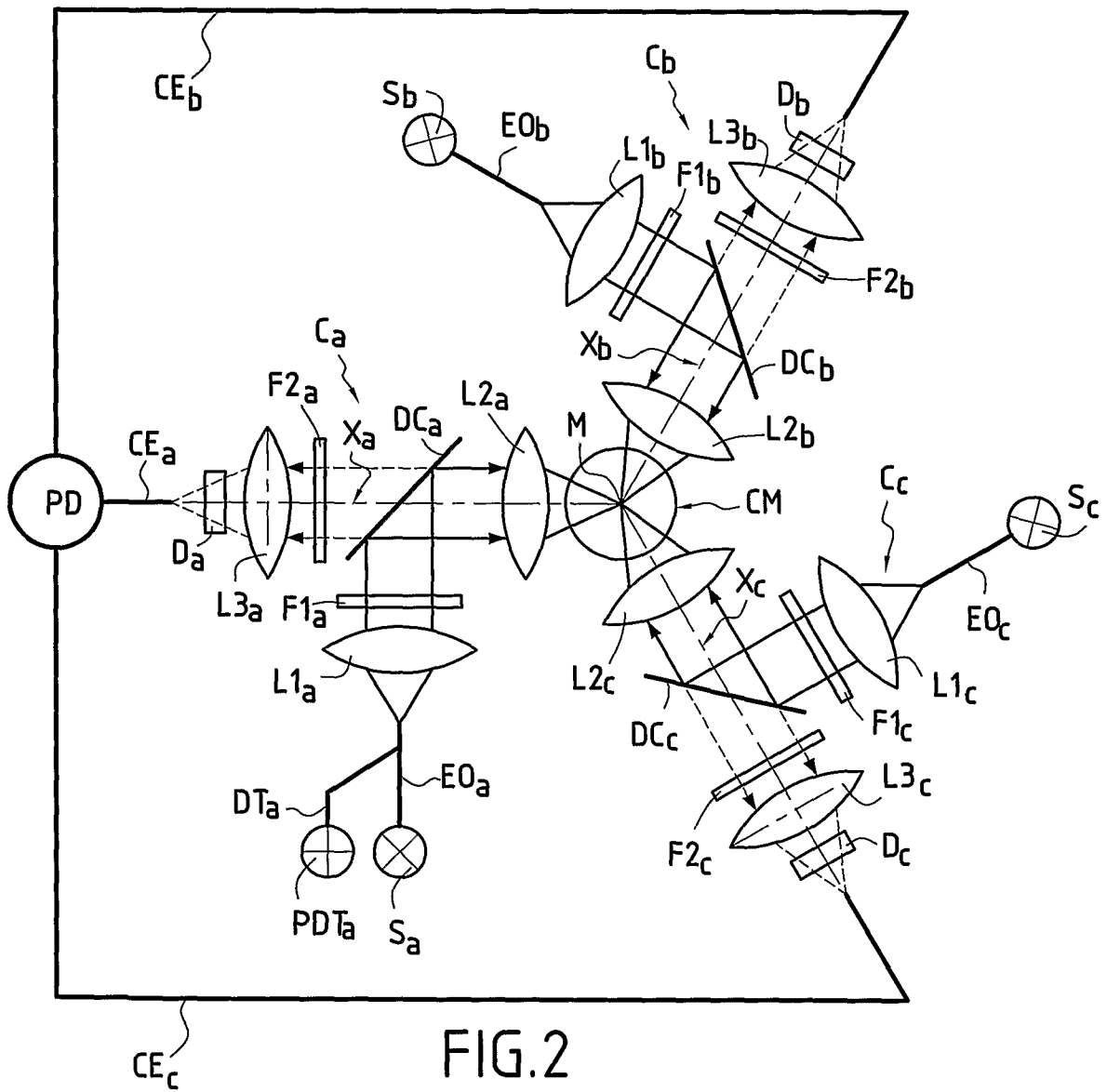
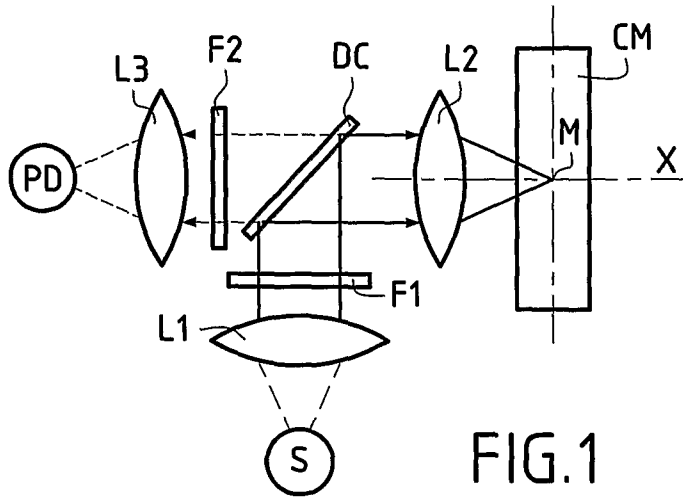
15. Procédé de mesure de photoluminescence et de mesure d'absorbance et/ou de diffraction dans un fluide présent dans une cuve de mesure selon lequel le fluide dans la cuve de mesure reçoit simultanément au moins deux faisceaux d'excitation en provenance de deux systèmes optiques comprenant chacun une source de lumière de faible cohérence spatiale envoyant ledit faisceau d'excitation vers la cuve de mesure selon un axe dit du système et un élément de capture destiné à recevoir un faisceau d'émission de photoluminescence centré sur l'axe du système en provenance du fluide, lesdits systèmes optiques étant positionnés pour que leurs axes fassent entre eux un angle non nul et distinct de 180° autour de la cuve de mesure, ladite mesure de photoluminescence étant déduite d'un couplage de données obtenues à partir des faisceaux d'émission capturés simultanément par les éléments de capture, le procédé étant tel que, les systèmes optiques étant positionnés de telle manière qu'il existe un faisceau de recouvrement partiel entre le faisceau d'excitation de la source d'un premier système optique et le faisceau d'émission capté par l'élément de capture d'au moins un second système optique, au moins une lumière à la longueur d'onde de l'excitation est captée dans le faisceau de recouvrement partiel par au moins un

20

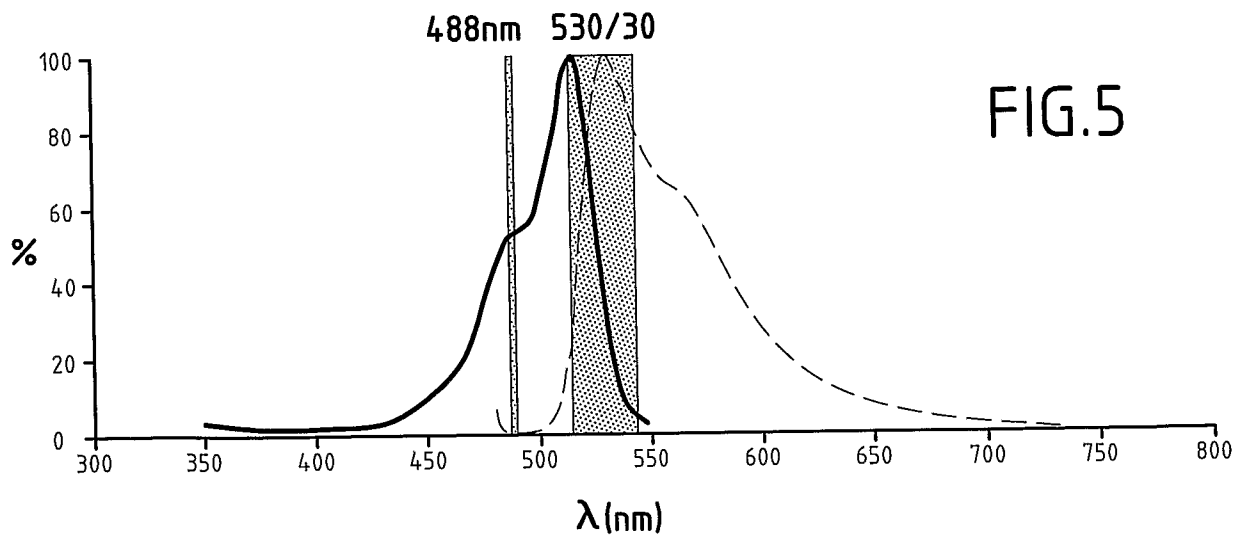
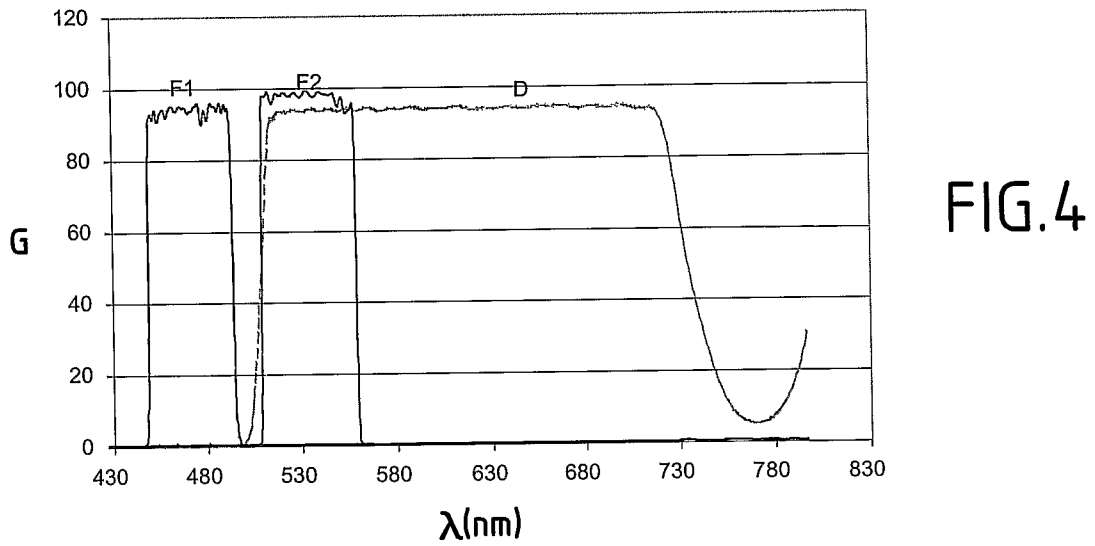
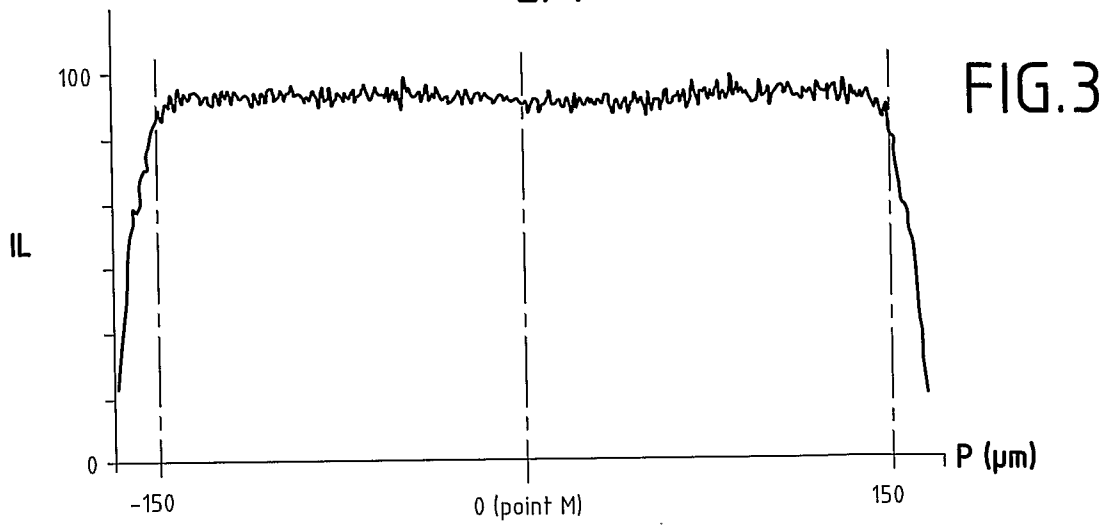
25

30

élément de capture dit d'extinction placé au voisinage d'au moins une des sources, une mesure d'absorbance et/ou de diffraction étant déduite de données obtenues à partir de la lumière captée par l'élément de capture d'extinction.



2/7



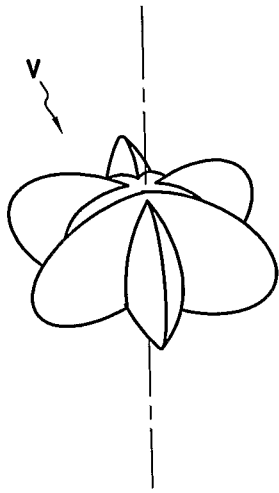


FIG. 6

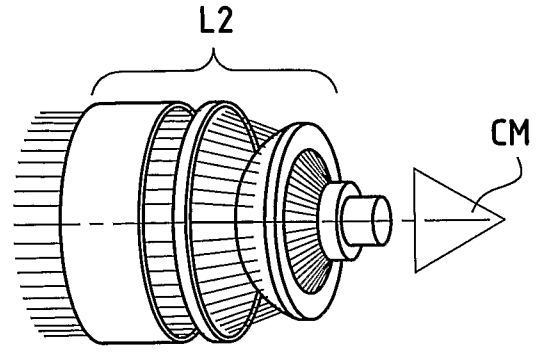


FIG. 8

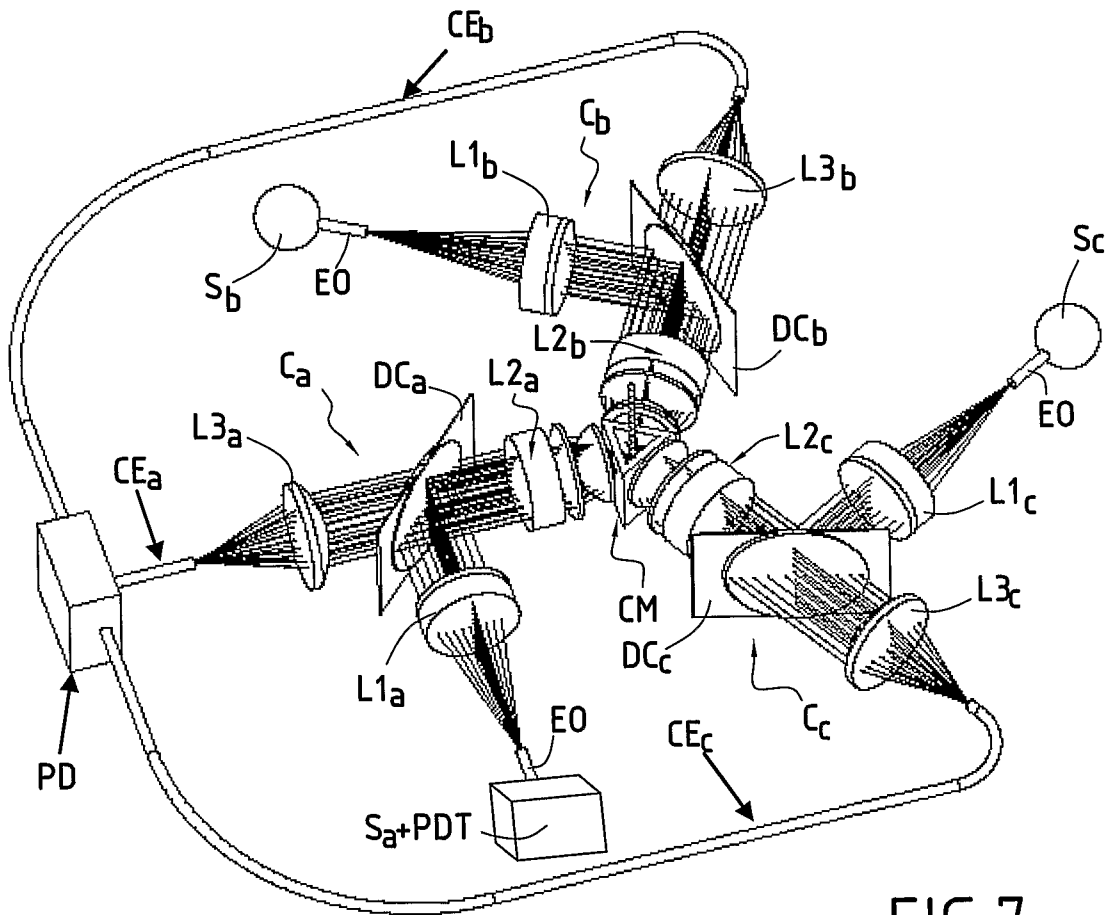


FIG. 7

4/7

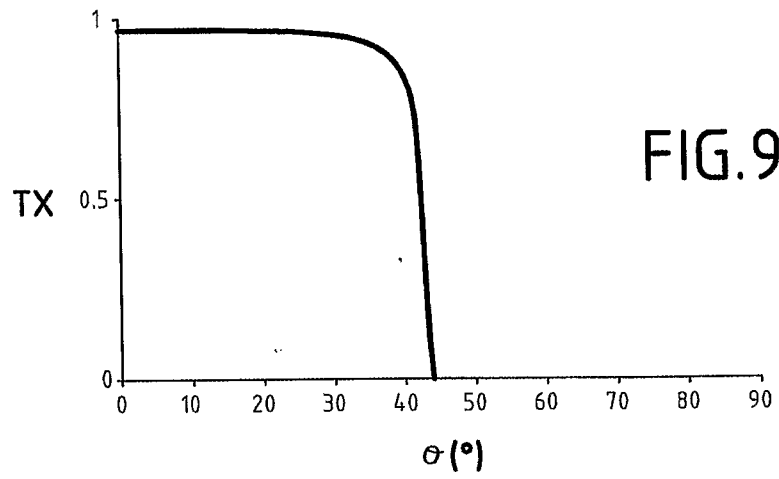


FIG.9

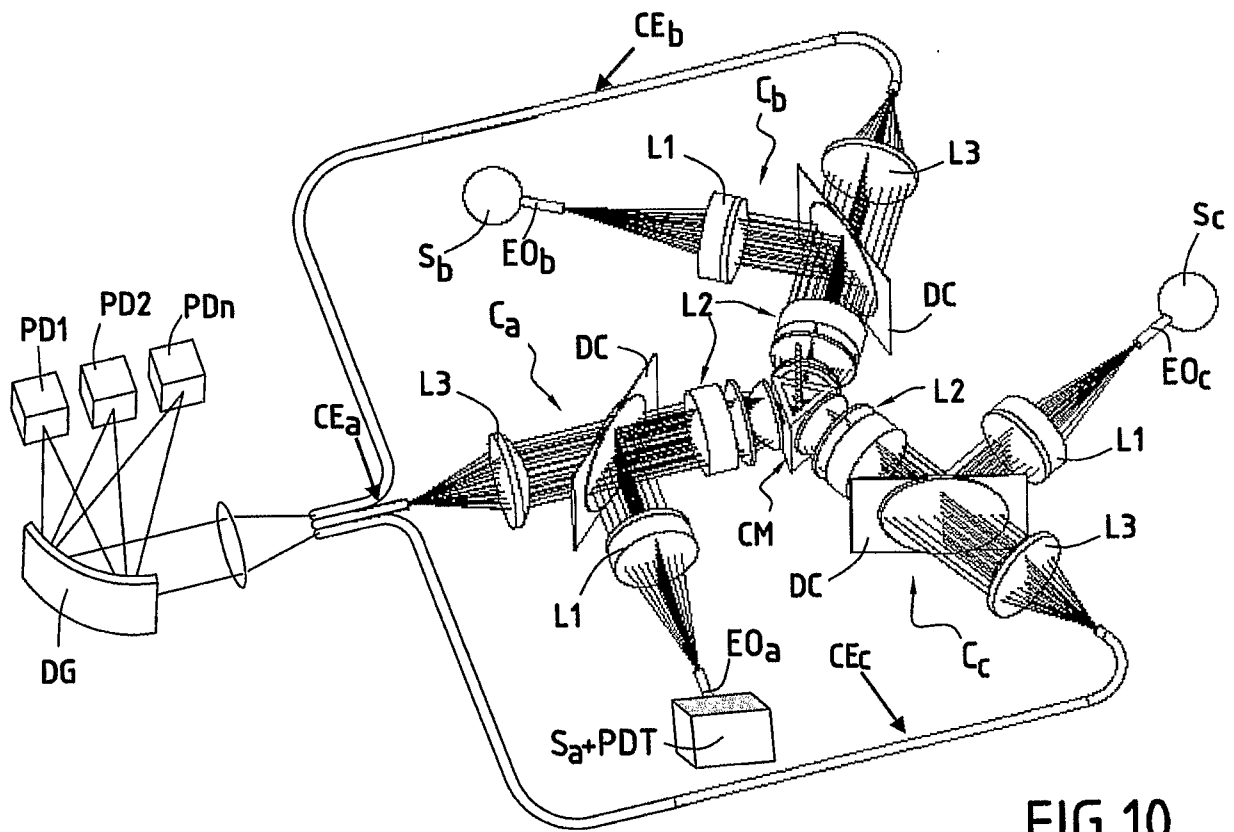


FIG.10

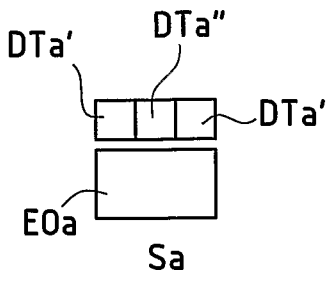


FIG. 11A

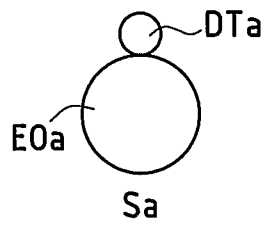


FIG. 11B

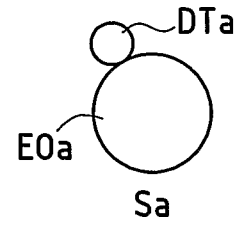


FIG. 11C

FIG. 12A

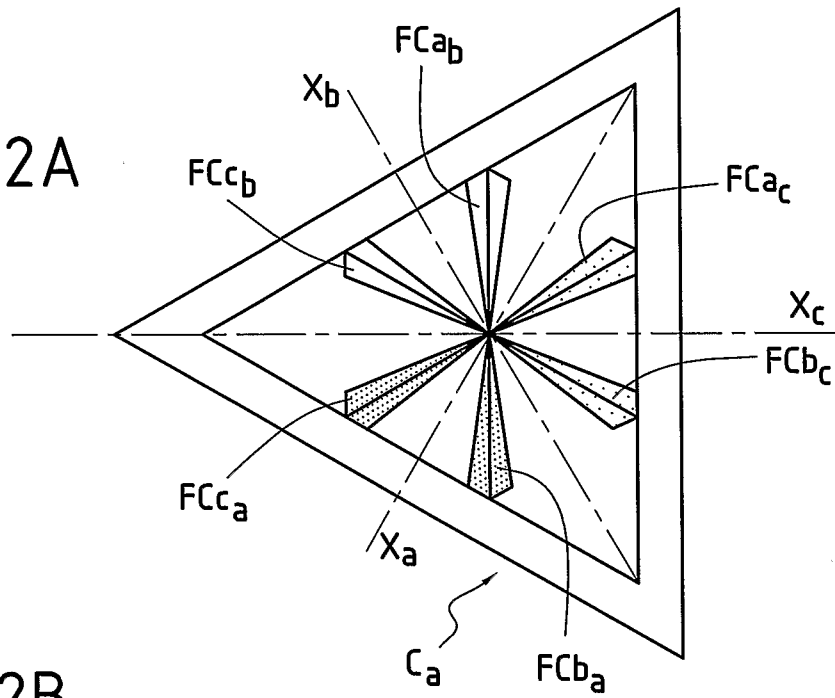
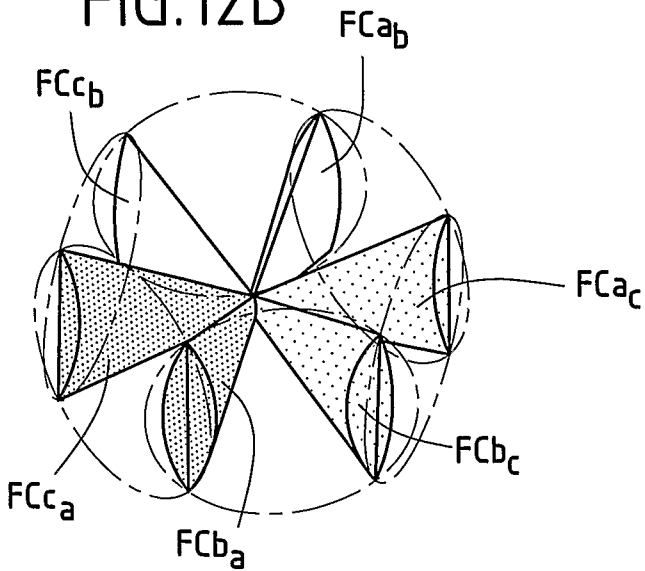


FIG. 12B



6/7

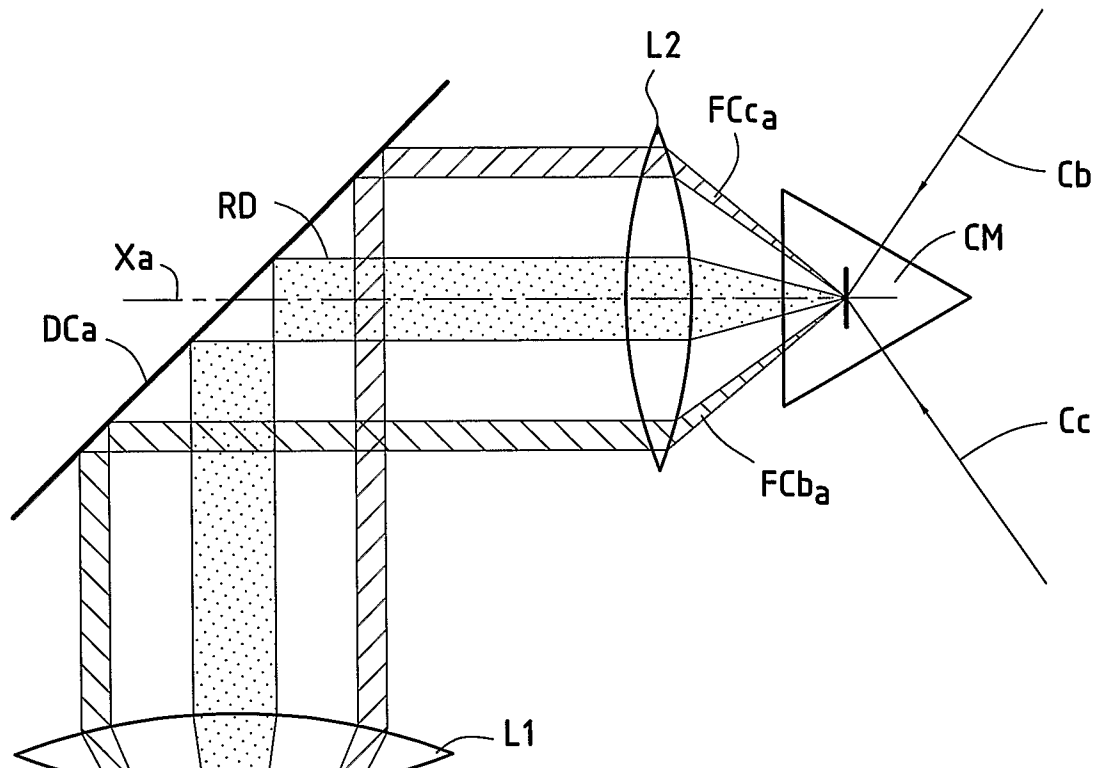


FIG.13

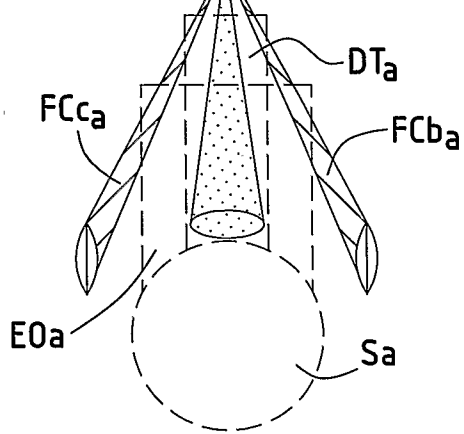
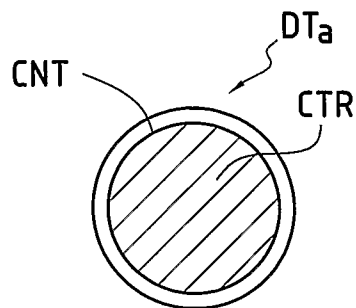


FIG.14



7/7

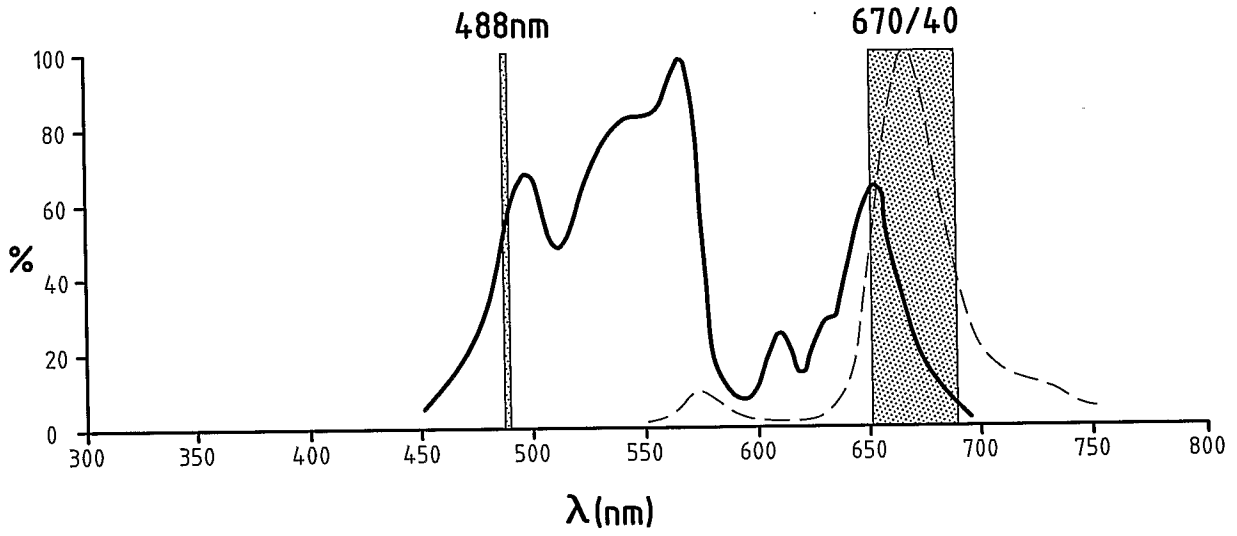


FIG.15

IF (pW)

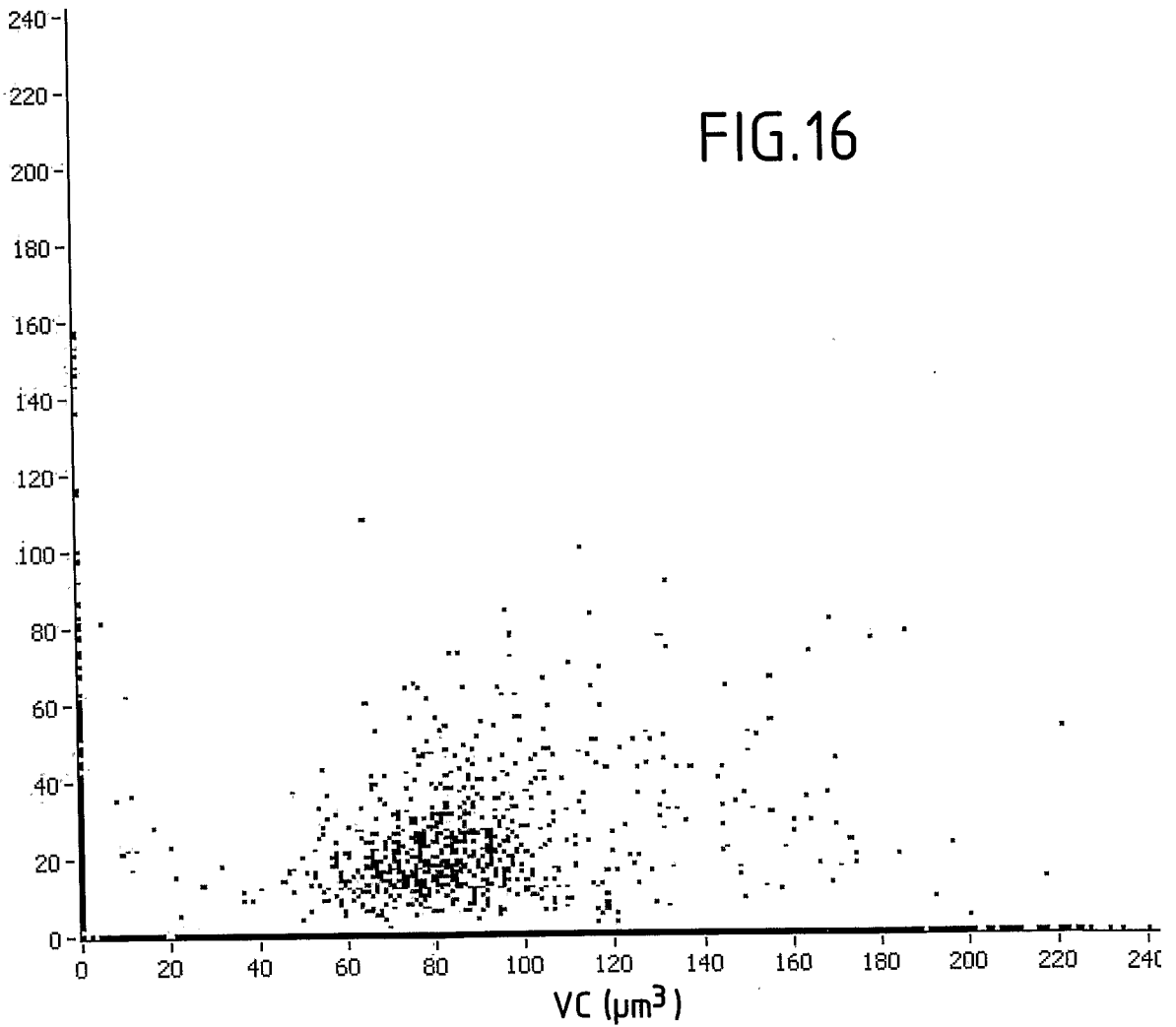


FIG.16