

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 951 271

②1 N° d'enregistrement national : **09 04912**

⑤1 Int Cl⁸ : **G 01 N 21/64** (2006.01), **G 01 J 3/457**, **G 02 B 21/00**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 13.10.09.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 15.04.11 Bulletin 11/15.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE
DE TROYES Etablissement public à caractère scientifi-
que et culturel* — FR.

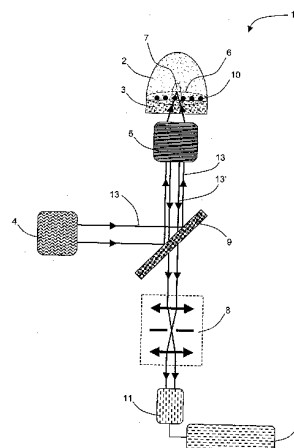
⑦2 Inventeur(s) : PLAIN JEROME et JAFFIOL RODOL-
PHE.

⑦3 Titulaire(s) : *UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE
TROYES Etablissement public à caractère scientifique
et culturel.*

⑦4 Mandataire(s) : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES.

⑤4 **SUPPORT D'ÉCHANTILLON, PROCÉDE ET SYSTÈME D'IMAGERIE PAR FONCTIONNALISATION DU SUBSTRAT.**

⑤7 La présente invention concerne un système d'imagerie pour l'analyse de particules fluorescentes dans un échantillon (2), comprenant un dispositif de microscopie confocale (1) comportant un support (3) en contact avec au moins une partie dudit échantillon (2). Dans ce système, la surface du support (3) en contact avec l'échantillon (2) est fonctionnalisée de manière à réduire axialement le volume d'observation (6) des particules au niveau de la surface. La présente invention concerne également différentes utilisations d'un tel système, un support d'échantillon destiné à équiper un tel système, ainsi qu'un procédé d'analyse de particules fluorescentes dans un échantillon mis en oeuvre par un tel système.



FR 2 951 271 - A1



SUPPORT D'ECHANTILLON, PROCEDE ET SYSTEME D'IMAGERIE PAR FONCTIONNALISATION DU SUBSTRAT

5 DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention se rapporte au domaine de l'analyse optique (imagerie et spectroscopie) de particules luminescentes ou optiquement diffusantes.

- 10 Elle se rapporte plus particulièrement à un système d'imagerie pour l'analyse de particules fluorescentes dans un échantillon, comprenant un dispositif de microscopie confocale comportant un support en contact avec au moins une partie de cet échantillon. Ce système d'imagerie trouve ses applications principalement dans la réalisation d'un système de spectroscopie par corrélation de fluorescence, ainsi que
- 15 l'observation et l'étude des points de contact entre une cellule et le support de ce système d'imagerie en milieu biologique.

Elle se rapporte également à un support d'échantillon destiné à équiper un tel système d'imagerie, ainsi qu'à un procédé d'analyse de particules fluorescentes dans

20 un échantillon par un tel système d'imagerie.

ÉTAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

Un problème technique général dans ce domaine a trait à la détection de molécules

25 fluorescentes individuelles, que ce soit par imagerie en général ou bien plus spécifiquement par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS). Les molécules qu'il s'agit de détecter sont des molécules fluorescentes, situées par exemple dans un milieu biologique.

30 Une détection de molécule unique impose généralement l'utilisation d'un solvant ultra pur (par exemple de l'eau pure) afin de diminuer le plus possible le bruit de fond de l'environnement. Or, ces conditions de pureté de la solution ne sont jamais obtenues

dans le cas d'expériences en milieu biologique *in vivo*, pour lesquelles le rapport signal-sur-bruit est considérablement détérioré par l'existence d'un bruit de fond, du fait principalement du phénomène d'auto-fluorescence des cellules, ainsi que de la diffusion Raman des composants et de l'environnement cellulaire.

5

Ce bruit de fond dépend de la taille du volume d'observation : plus le volume d'observation est grand, plus le bruit de fond sera important. Par conséquent, afin d'éliminer le bruit de fond, un premier problème à résoudre concerne la réduction de la taille du volume d'observation.

10

Par ailleurs, la détection de molécules individuelles impose également d'avoir une très faible quantité de molécules dans le volume d'observation, idéalement au plus une seule molécule. De telles conditions d'observation peuvent être obtenues en utilisant des solutions de fluorophores suffisamment diluées, mais aussi en diminuant

15 le plus possible le volume de détection. Pour atteindre ce but, il peut être utilisé un microscope confocal, disposant avantageusement d'un objectif de grande ouverture numérique. Un tel type de microscope ne permet cependant pas de détecter des espèces chimiques présentes dans des concentrations dépassant la centaine de nanomoles par litre, ni de détecter des temps de diffusion supérieurs à quelques
20 centaines de millisecondes.

Dès lors, il apparaît nécessaire, conformément au premier problème ci-dessus, de réduire la taille du volume d'observation au-delà de ce qu'offre un microscope confocal, de manière à rendre « visible » les fluctuations du signal de fluorescence et
25 ainsi réaliser une mesure de FCS avec une plus grande précision.

Plusieurs solutions sont connues pour adresser ce problème de détection individuelle des molécules en milieu biologique.

30 Une première solution (technique dite STED pour « déplétion d'émission stimulée ») consiste à utiliser deux sources lasers femtosecondes (ou picosecondes) qui soient synchrones. Cette technique en champ lointain repose sur une inhibition du signal de

fluorescence via une voie concurrente de relaxation : l'émission stimulée. Cette émission stimulée permet alors de « rogner » la tâche de focalisation de l'illumination laser excitatrice, permettant ainsi de réduire les dimensions latérale et axiale du volume confocal.

5

Néanmoins, la complexité liée à l'utilisation de ce type de source lumineuse et à leur mise en œuvre en microscopie rend cette technique complexe.

Une seconde solution (technique dite STORM pour « microscopie par reconstruction
10 optique stochastique », ou PALM pour « microscopie par localisation de photo-activation ») est basé sur une localisation très précise du signal de fluorescence de molécules individuelles observées à l'aide d'un microscope grand champ conventionnel. Même si l'image en champ lointain d'une molécule unique est limitée par la diffraction, il est toujours possible de trouver la position précise de la molécule
15 (i.e. la position centrale du spot limité par la diffraction). Une nouvelle image représentant les positions exactes des molécules peut alors être construite, ce qui permet de visualiser avec une très grande précision des protéines membranaires.

Cependant, cette solution présente l'inconvénient d'exiger des temps d'acquisition
20 trop longs pour envisager des études dynamiques, comme des déplacements de protéines par exemple.

Une troisième solution consiste à utiliser un microscope de type SNOM, qui repose sur l'utilisation d'un microscope optique de champ proche. L'illumination local de
25 l'échantillon se fait par exemple à l'aide d'une fibre optique étirée et métallisée. On obtient alors une « nano-source » de lumière à l'extrémité de la fibre. Dès lors, seules les molécules présentes au niveau de l'extrémité seront excitées.

Néanmoins, cette technique s'avère également complexe à mettre en œuvre en
30 milieu biologique, pour des raisons analogues à celles évoquées en rapport à la seconde solution ci-dessus (STORM).

De ce fait, il n'existe pour l'heure aucune solution simple à mettre en œuvre et qui puisse être compatible avec une observation de fluorescence conventionnelle, afin d'éviter de reconstruire un nouveau système de spectroscopie par FCS, tout en offrant une réduction du volume d'observation.

5

A cet égard, deux autres techniques sont connues comme susceptibles de s'adapter à la fluorescence conventionnelle.

10

Une première technique dite SPCE consiste à exciter la fluorescence au voisinage direct d'un film métallique mince. L'illumination laser induit l'excitation d'un plasmon de surface délocalisé dans le film métallique et c'est le plasmon qui va finalement exciter la fluorescence.

15

Une seconde technique dite à nano-trous permet de réduire la taille du volume d'observation latéralement et axialement, ainsi que d'amplifier le signal de fluorescence. Pour cela, des trous de taille nanométrique sont réalisés dans un film métallique. L'excitation reste alors confinée dans le trou.

20

Ces deux dernières techniques ne permettent cependant pas d'imager un objet dans son ensemble, comme des cellules vivantes. La couche métallique peut modifier l'adhésion des cellules et surtout empêcher toute observation à l'aide de technique usuelle en biologie (contraste de phase, DIC, RICM).

25

Ainsi, il apparaît qu'aucune solution de l'état de la technique ne permet de réduire de manière significative les dimensions du volume d'observation (typiquement quelques attolitres) pour réaliser une imagerie et/ou une spectroscopie de fluorescence locale, tout en permettant d'imager, en milieu biologique, un ensemble de cellules vivantes avec une résolution axiale très faible (inférieure à 10nm).

30

OBJET DE L'INVENTION

Le but de la présente invention est de remédier à ce problème technique, en

modifiant uniquement le substrat (ou support de l'échantillon contenant les cellules vivantes). Pour cela, la présente invention repose sur une nouvelle architecture du substrat servant de support au milieu biologique à analyser, cette nouvelle architecture offrant une fonctionnalisation chimique de la surface du support de l'échantillon.

Plus précisément, la présente invention a pour objet un système d'imagerie pour l'analyse de particules fluorescentes dans un échantillon, comprenant un dispositif de microscopie confocale comportant un support en contact avec au moins une partie de l'échantillon. Dans ce système, la surface du support en contact avec l'échantillon est fonctionnalisée de manière à réduire axialement le volume d'observation des particules au niveau de cette surface.

Une telle fonctionnalisation de la surface du support permet de réduire le volume d'observation (i.e. de collection) de la fluorescence émise par les particules dans le milieu à analyser. On rend ainsi possible la détection de la fluorescence d'un nombre plus réduit de particules tout en maximisant le rapport signal sur bruit.

En outre, cette fonctionnalisation de la surface du support (transparent) ne modifie quasiment pas sa transparence, ce qui permet de réaliser des images en contraste de phase, DIC ou RICM en milieu biologique. De surcroît, cette fonctionnalisation s'avère peu onéreuse et ne nécessite pas de lourd appareillage pour être mise en œuvre.

De préférence, cette fonctionnalisation de la surface du support consiste à activer cette surface de manière à ce que les particules au niveau et à proximité de celle-ci soient excitées via un transfert d'énergie non-radiatif provenant de nano-objets luminescents préalablement excités.

Dès lors, grâce à cette activation, au lieu d'exciter directement l'échantillon avec une source laser focalisée, on rend possible une excitation via un transfert d'énergie non-radiatif au niveau de la surface du support.

De préférence encore, cette activation de la surface du support est obtenue en la revêtant au moins en partie par une pluralité de nano-objets luminescents agencés pour que l'énergie de ces nano-objets soit transférée de manière non-radiative en direction des particules présentes au niveau et à proximité de cette surface.

Ces nano-objets luminescents sont également appelés boîtes quantiques. Ces nano-objets présentent un certain nombre de propriétés parmi lesquelles, en comparaison avec les fluorophores (i.e. les molécules organiques fluorescentes), une grande photostabilité (peu ou pas de photoblanchiment à température ambiante) et un intense signal de luminescence.

On réalise ainsi un transfert d'énergie non-radiatif (FRET) entre ces nano-objets et les fluorophores. La boîte quantique est le donneur, le fluorophore l'accepteur. De manière chronologique, le donneur absorbe les photons incidents produits par une source laser dans le bleu et se trouve alors dans un état excité. Il s'opère ensuite le FRET. L'accepteur, qui était initialement dans son état fondamental, passe alors dans son état excité et peut ainsi émettre des photons de fluorescence par relaxation radiative. Ce sont ces photons de fluorescence émis vers le rouge que l'on détecte.

Il est clair pour l'homme du métier que le processus FRET est d'autant plus efficace que la distance entre boîte quantique et fluorophore est petite. Typiquement, on n'observe plus ce phénomène au-delà d'une distance supérieure à 10nm. De ce fait, au voisinage d'une surface fonctionnalisée par des boîtes quantiques, il est possible de créer un volume d'excitation (qui se traduit au moment de la collection de la lumière fluorescente par un volume d'observation) défini par la portée du FRET, c'est-à-dire dont la profondeur ne dépasse pas une dizaine de nanomètres.

Par conséquent, il apparaît que la fonctionnalisation par un revêtement de nano-objets luminescents offre les avantages suivants :

- une détection sélective (pour sélectionner une seule espèce chimique),
- l'affranchissement du bruit de fond, surtout de l'auto-fluorescence,

- la détection de molécules uniques dans une gamme de concentration usuelle en biologie du vivant (gamme de la micromole et plus), et
- la possibilité d'étudier la diffusion dans les systèmes très visqueux, denses et hétérogènes.

5

Selon différents modes de réalisation particulier, ces nano-objets luminescents :

- se présentent sous la forme de nano-cristaux semi-conducteurs luminescents,
- sont de forme sphérique.

- 10 Selon ou mode de réalisation particulier dans lequel on cherche à cartographier la présence d'au moins deux espèces chimiques différentes dans une cellule, il peut être prévu que le système d'imagerie selon l'invention comprenne au moins deux types de nano-objets luminescents différents agencés pour que leurs énergies soient transférées de manière non-radiative en direction de particules présentes au niveau
- 15 et à proximité de ladite surface et de natures différentes.

De manière avantageuse, il peut être également prévu que le dispositif de microscopie confocale soit muni :

- d'un moyen de focalisation agencé de manière à collecter la lumière générée par fluorescence par les particules au niveau de la zone de focalisation générée par ledit moyen de focalisation, et/ou
- d'un moyen de filtrage spatial apte à créer un volume confocal englobant le volume d'observation des particules au niveau de ladite surface du support en contact avec ledit échantillon.

25

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un système d'imagerie tel que décrit ci-dessus pour réaliser un système de spectroscopie par corrélation de fluorescence, le dispositif de microscopie confocale étant muni d'un moyen d'illumination apte à émettre un faisceau lumineux d'excitation en direction de l'échantillon.

30

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un système d'imagerie tel que décrit ci-dessus pour déterminer les positions des points de contact entre une cellule

vivante et le support du système.

5 L'invention a également pour objet un support d'échantillon destiné à équiper le dispositif de microscopie confocale d'un système d'imagerie pour l'analyse de particules fluorescentes dans un échantillon, de sorte que le support soit en contact avec au moins une partie dudit échantillon. La surface de ce support en contact avec l'échantillon présente la particularité d'être fonctionnalisée de manière à réduire axialement le volume d'observation des particules au niveau de ladite surface.

10 L'invention a enfin pour objet un procédé d'analyse de particules fluorescentes dans un échantillon par un système d'imagerie, comprenant un dispositif de microscopie confocale comportant lui-même un support en contact avec au moins une partie de l'échantillon. Ce procédé est remarquable notamment en ce que la surface du support en contact avec l'échantillon est préalablement fonctionnalisée de manière à
15 réduire axialement le volume d'observation des particules au niveau de ladite surface.

BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

20 L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée d'un exemple non limitatif de réalisation, accompagnée de figures représentant respectivement :

- la figure 1, un schéma d'un système d'imagerie selon l'invention, utilisé pour réaliser un système de spectroscopie par corrélation de fluorescence,
- la figure 2, un schéma illustrant la fonctionnalisation du support dans le cas
25 d'un éclairage focalisé, et
- la figure 3, un schéma illustrant la fonctionnalisation du support dans le cas d'un éclairage grand champ.

EXPOSE DETAILLE DE MODES DE REALISATION PARTICULIERS

30

La figure 1 représente un schéma d'un système d'imagerie selon l'invention, utilisé pour réaliser un système de spectroscopie par corrélation de fluorescence.

Ce système vise à analyser un échantillon 2. Cet échantillon peut être un milieu liquide, gazeux, ou un objet biologique contenant des particules à analyser. Les particules à analyser sont des molécules ou des assemblages moléculaires, par exemple des complexes moléculaires, des nanocristaux ou des nanobilles, et présentent des dimensions inférieures à la longueur d'onde de la lumière émise par les moyens d'illumination.

Ce comprend un dispositif de microscopie confocale 1. Ce dispositif est un arrangement comportant un support 3, un moyen d'illumination 4, un moyen de focalisation 5, un moyen de séparation dichroïque 9, un moyen de filtrage spatial 8, un moyen de détection 11, et un moyen de traitement 12.

Le support est constitué d'un substrat de verre, tel qu'une lamelle de microscope. Ce substrat supporte l'échantillon 2, qui est avantageusement enfermé dans une boîte étanche (boîte de Pétri) dont les parois latérales sont formées par des cales autocollantes résistantes à l'eau.

Le moyen d'illumination 4 émet un faisceau lumineux d'excitation 13. Ce faisceau 13 est collimaté en sortie du moyen d'illumination 4. Il peut être par exemple constitué d'une source laser.

L'homme du métier notera cependant que l'excitation des nano-objets luminescents peut être réalisée par un rayonnement lumineux ou bien par toute autre technique d'excitation connue dans le domaine en cause, par exemple par excitation électrique, excitation chimique, excitation nucléaire ou bien au moyen d'une excitation indirecte par transfert d'énergie non radiatif (par exemple de l'oxyde de zinc ZnO excité électriquement qui transmet son énergie de manière non-radiative aux nano-objets luminescents qui eux-mêmes transfèrent leur énergie de manière non-radiative aux fluorophores).

Le faisceau lumineux d'excitation 13 est dirigé vers le moyen de séparation

dichroïque 9 (par exemple un filtre dichroïque coupe-bande), disposé à 45° du faisceau incident d'excitation 13. Le filtre dichroïque peut ainsi diriger, après réflexion sur lui, le faisceau lumineux d'excitation 13 vers le moyen de focalisation 5.

- 5 Ce moyen 5 permet de diriger le faisceau vers une zone de focalisation 7 sur l'échantillon 2 au travers du système de microscopie confocale 1. Ces moyens 5 sont pour cela constitués d'un objectif de microscope ou d'une lentille, avantageusement avec une grande ouverture numérique (par exemple 1,2) afin de collecter une intensité lumineuse de fluorescence optimale.

10

Le faisceau lumineux d'excitation 13 ainsi focalisé interagit avec des particules en solution dans l'échantillon 2 selon un phénomène de fluorescence. Chaque particule excitée va émettre par fluorescence une réponse lumineuse à une longueur d'onde supérieure à celle du faisceau d'excitation 13. Une partie de cette réponse lumineuse
15 est alors collectée par le moyen de focalisation 5 de sorte à former un faisceau lumineux de réponse 13'.

Ce faisceau lumineux de réponse 13' est envoyé vers le moyen de détection 11 au travers des moyens respectivement de focalisation 5, de séparation dichroïque 9 et
20 de filtrage spatial 8. La longueur d'onde de coupure du filtre dichroïque est choisie de sorte à transmettre le faisceau lumineux de réponse 13', dont la longueur d'onde est supérieure à celle du faisceau d'excitation 13.

Afin de réaliser la détection du faisceau de réponse 13', le moyen de filtrage spatial 8
25 comprend en outre un ensemble de lentilles permettant de conjuguer le plan focal du moyen de focalisation 5 avec le capteur du moyen de détection 11. Les moyens de filtrage spatial 8 comprennent également une ouverture de dimension réglable, disposée suivant l'axe optique du système. Elle est conjugué optiquement avec la zone de focalisation 7 du moyen de focalisation 5.

30

Ce moyen de filtrage spatial 8 permet de sélectionner un volume de détection – ou volume de filtrage spatial, ou encore volume confocal – autour de la zone de

focalisation 7, puisque des rayons lumineux ne provenant pas de ce volume de filtrage spatial ne traversent pas l'ouverture. Les dimensions de la zone de détection sont d'autant plus courtes que celles de l'ouverture le sont également.

- 5 Le moyen de détection 11 permet la mesure de l'intensité du flux lumineux de réponse 13' produit par l'interaction du faisceau d'excitation 13 sur l'échantillon 2 et collecté par le dispositif de microscopie confocale 1. Ce moyen 11 peut comprendre des photodétecteurs à amplification d'électrons, tels que des photodiodes fonctionnant en régime d'avalanche ou de cascade. Ces photodétecteurs peuvent
10 également être des photomultiplicateurs, des photodétecteurs à amplification optique, des caméras CCD ou CMOS refroidies.

- Le signal issu du moyen de détection 11 est envoyé vers des moyens de traitement 12 du signal. Ce moyen 12 comprend un compteur et un corrélateur qui permet de
15 traiter numériquement les données reçues. le compteur réalise l'enregistrement de la valeur de l'intensité lumineuse de fluorescence reçue et le corrélateur réalise l'analyse temporelle des fluctuations de l'intensité lumineuse de fluorescence reçue. Cette analyse peut se faire aux temps courts et aux temps longs de sorte à obtenir des informations complémentaires sur les particules en solution dans l'échantillon 2.
20 Aux temps courts, la fonction d'autocorrélation de l'intensité lumineuse détectée permet d'avoir accès aux paramètres photophysiques des émetteurs ainsi qu'au nombre moyen de molécules détectées. Aux temps longs, cette fonction renseigne sur le temps de séjour moyen – temps de diffusion – des molécules et sur leur mode de diffusion au travers du volume de filtrage spatial.

- 25 Conformément à l'invention, le support 3 est revêtu au moins en partie par une pluralité de nano-objets luminescents 10. Ces nano-objets se présentent sous la forme de nano-cristaux semi-conducteurs luminescents de forme sphérique, encore appelés boîtes quantiques.

- 30 Ces boîtes quantiques 10, disposées ainsi sur le support 3, permettent un transfert non-radiatif d'énergie (FRET) avec les fluorophores à proximité de la surface du

support 3, c'est-à-dire à proximité de ces boîtes 10. Seuls les photons de fluorescence générés par des fluorophores à proximité de ces boîtes ne pourront être obtenus. Dès lors, seule la fluorescence des particules correspondantes ne pourra être détectée.

5

S'en suit donc une diminution du volume d'excitation du fait des boîtes 10, et donc une diminution du volume d'observation 6, puisque l'on ne pourra observer que la fluorescence des particules proches des boîtes 10 et donc on ne pourra observer que la fluorescence des particules contenues dans un volume d'observation 6
10 délimité par la position de ces boîtes. Ce volume 6 étant limité dans le sens axial (i.e. dans le sens de l'axe optique), le volume d'observation 6 s'en trouve réduit dans le sens axial.

15

Il apparaîtra immédiatement à l'homme du métier que tout type d'éléments (autres que nano-objets luminescents) pourra être utilisé dans le cadre de l'invention, dans la mesure où ces éléments sont susceptibles de donner lieu à une excitation des fluorophores en solution par FRET entre ces éléments (donneurs) et les fluorophores (accepteurs. De même, la forme de ces éléments peut être différente de la forme sphérique décrite ci-dessus.

20

Les figures 2 et 3 représentent des schémas de systèmes d'imagerie selon des modes de réalisation de l'invention, avec des éclairages respectivement focalisés et grand champ.

25

Dans ces deux variantes, on cherche à imager une cellule vivante 14 présente dans le milieu biologique 2. Des boîtes quantiques 10 sont pour cela déposées sur le substrat 3, de sorte à générer un transfert d'énergie non-radiatif en direction des fluorophores du milieu 2 sur une faible étendue axiale, représentée par le volume 6 délimité par des pointillés.

30

En référence à la figure 2, il est pratiqué un éclairage focalisé 13, à l'aide de moyens de focalisation adéquats. Le point de focalisation visé se situe au niveau de la

surface supérieure du substrat 3, où sont disposés les boîtes quantiques 10. On obtient alors une tâche de focalisation correspondant au volume 7 délimité par des pointillés.

- 5 En référence à la figure 2, il est pratiqué un éclairage grand champ 13, à l'aide de moyens de collimation ou autres. Cet éclairage vise une partie du substrat 3, selon une inclinaison non-nulle vis-à-vis de la perpendiculaire à la surface de ce substrat. Une partie 13a de la lumière traverse ainsi le substrat, tandis qu'une autre partie 13b est réfléchiée sur sa surface.

10

Le transfert d'énergie non-radiatif se produit à chaque fois dans la zone délimitée par le volume 6, ce qui permet de n'imager que la zone à proximité du substrat 3. Le volume d'observation s'en trouve donc réduit axialement. Parmi les applications possibles de ce type de réalisation, il est possible d'imager une cellule vivante 14 de sorte à voir quels sont ses points de contact avec le substrat 3, ce que ne permettait pas jusqu'alors les systèmes d'imagerie et/ou de spectroscopie connus dans l'état de la technique.

15

20

Les modes de réalisation précédemment décrits de la présente invention sont donnés à titre d'exemples et ne sont nullement limitatifs. Il est entendu que l'homme du métier est à même de réaliser différentes variantes de l'invention sans pour autant sortir du cadre du brevet.

REVENDEICATIONS

- 1 – Système d'imagerie pour l'analyse de particules fluorescentes dans un échantillon (2), comprenant un dispositif de microscopie confocale (1) comportant un support (3) en contact avec au moins une partie dudit échantillon (2), **caractérisé en ce que** la surface du support (3) en contact avec ledit échantillon (2) est fonctionnalisée de manière à réduire axialement le volume d'observation (6) des particules au niveau de ladite surface.
- 2 – Système d'imagerie selon la revendication 1, dans lequel la fonctionnalisation de la surface du support (3) consiste à activer ladite surface de manière à ce que les particules au niveau et à proximité de ladite surface soient excitées via un transfert d'énergie non-radiatif provenant de nano-objets luminescents (10) préalablement excités.
- 3 – Système d'imagerie selon la revendication 2, dans lequel l'activation de la surface du support (3) est obtenue en la revêtant au moins en partie par une pluralité de nano-objets luminescents (10) agencés pour que l'énergie desdits nano-objets soit transférée de manière non-radiative en direction des particules présentes au niveau et à proximité de ladite surface.
- 4 – Système d'imagerie selon la revendication 2 ou 3, dans lequel les nano-objets luminescents (10) se présentent sous la forme de nano-cristaux semi-conducteurs luminescents.
- 5 – Système d'imagerie selon l'une des revendications 2 à 4, dans lequel les nano-objets luminescents (10) sont de forme sphérique.
- 6 – Système d'imagerie selon l'une des revendications 2 à 5, comprenant au moins deux types de nano-objets luminescents (10) différents agencés pour que leurs énergies soient transférées de manière non-radiative en direction de particules présentes au niveau et à proximité de ladite surface et de natures différentes.

7 – Système d'imagerie selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le dispositif de microscopie confocale (1) est muni d'un moyen de focalisation (5) agencé de manière à collecter la lumière générée par fluorescence par les particules au niveau de la zone de focalisation (7) générée par ledit moyen de focalisation (5).

8 – Système d'imagerie selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le dispositif de microscopie confocale (1) est muni d'un moyen de filtrage spatial (8) apte à créer un volume confocal englobant le volume d'observation (6) des particules au niveau de ladite surface du support (3) en contact avec ledit échantillon (2).

9 – Utilisation d'un système d'imagerie selon l'une des revendications 1 à 8 pour réaliser un système de spectroscopie par corrélation de fluorescence, le dispositif de microscopie confocale (1) étant muni d'un moyen d'illumination (4) apte à émettre un faisceau lumineux d'excitation (13) en direction de l'échantillon (2).

10 – Utilisation d'un système d'imagerie selon l'une des revendications 1 à 8 pour déterminer les positions des points de contact entre une cellule vivante et le support (3) dudit système.

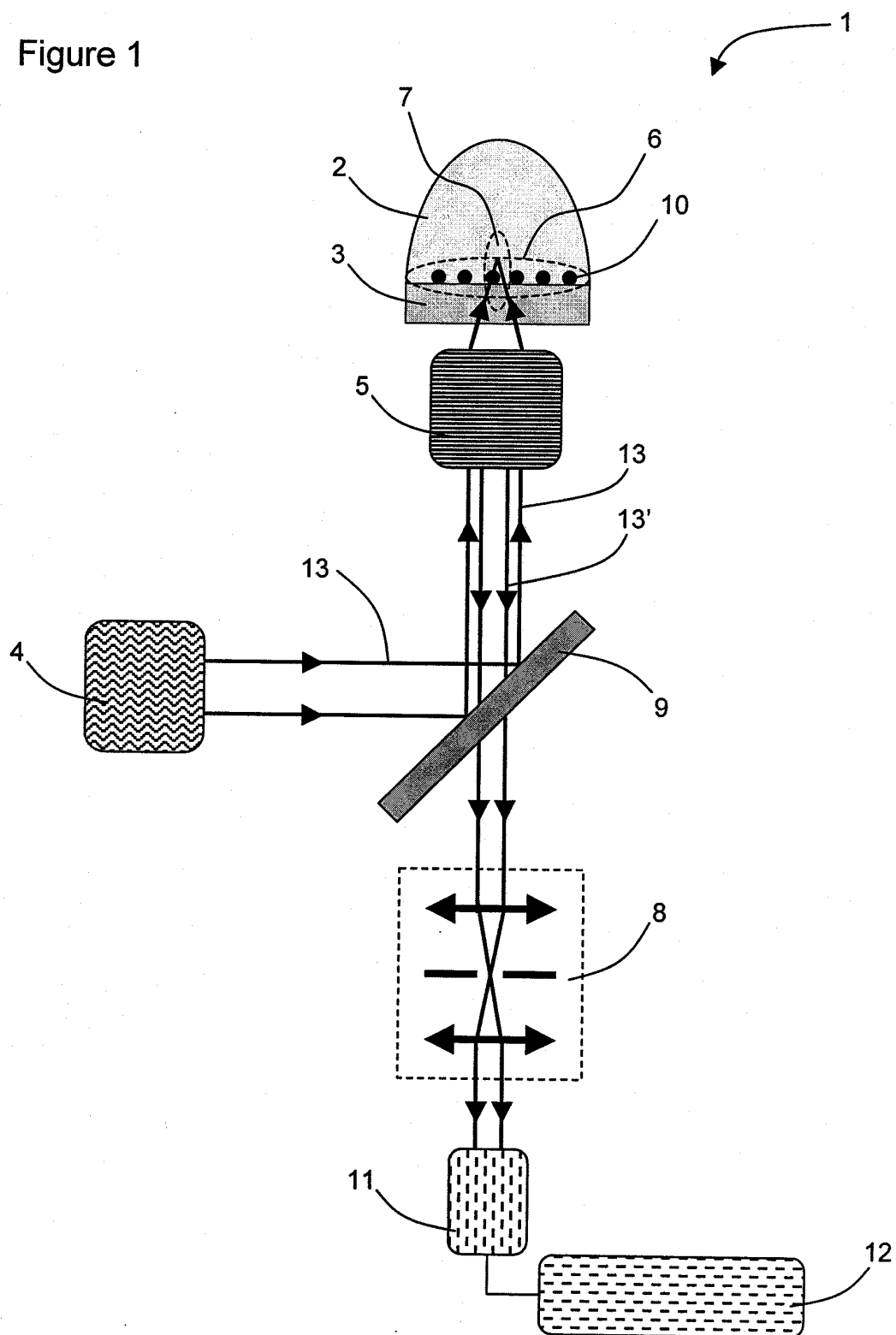
11 – Support (3) d'échantillon (2) destiné à équiper le dispositif de microscopie confocale (1) d'un système d'imagerie pour l'analyse de particules fluorescentes dans un échantillon (2), de sorte que le support (3) soit en contact avec au moins une partie dudit échantillon (2), **caractérisé en ce que** la surface dudit support (3) en contact avec ledit échantillon (2) est fonctionnalisée de manière à réduire axialement le volume d'observation (6) des particules au niveau de ladite surface.

12 – Procédé d'analyse de particules fluorescentes dans un échantillon (2) par un système d'imagerie, comprenant un dispositif de microscopie confocale (1) comportant un support (3) en contact avec au moins une partie dudit échantillon (2), **caractérisé en ce que** la surface du support (3) en contact avec ledit échantillon (2)

est préalablement fonctionnalisée de manière à réduire axialement le volume d'observation (6) des particules au niveau de ladite surface.

1/2

Figure 1



2/2

Figure 2

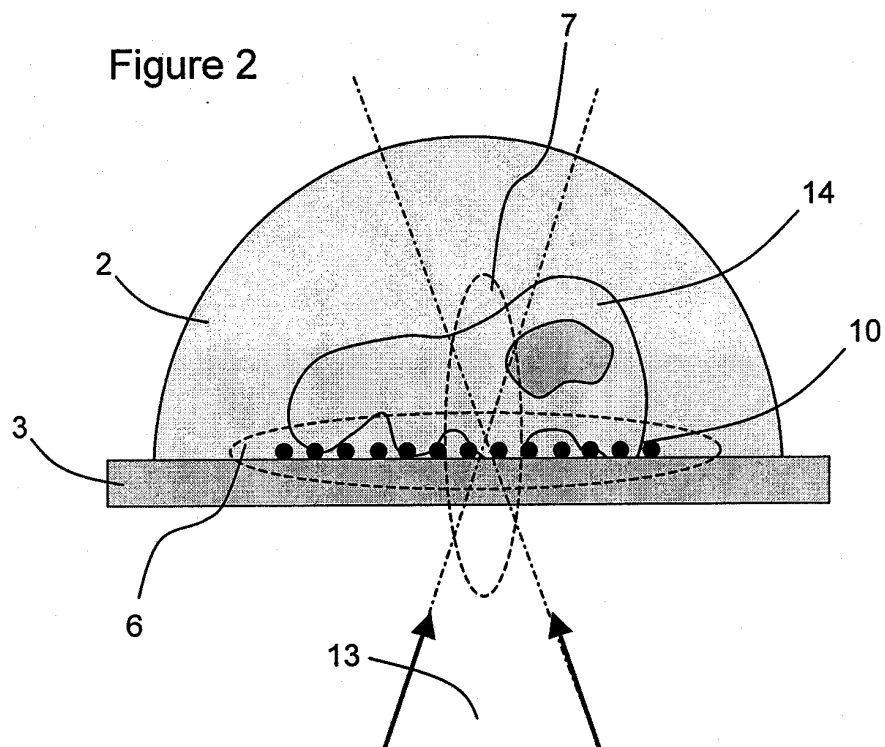
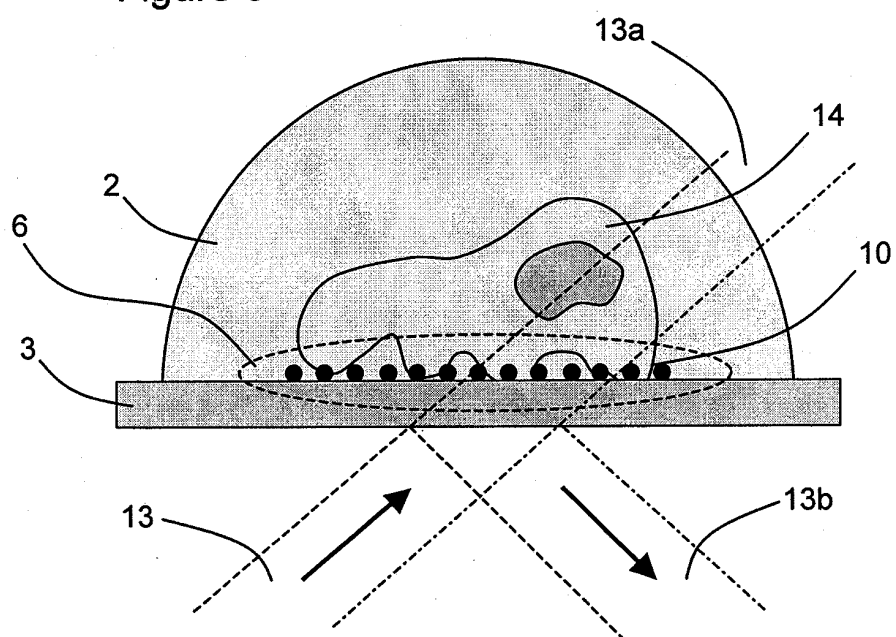


Figure 3





RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 727391
FR 0904912

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	MICHALET X ET AL: "ULTRAHIGH RESOLUTION MULTICOLOR COLOCALIZATION OF SINGLE FLUORESCENT NANOCRYSTALS" PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING, 20070911, SPIE, USA LNKD- DOI:10.1117/12.430768, vol. 4258, 24 janvier 2001 (2001-01-24), pages 8-15, XP008020909 ISSN: 0277-786X	1-8,11	G01N13//10# G01J3/457 G01N21/64 G02B21/00
Y	* page 9, alinéa 2 - page 10, alinéa 1 *	9	
A	* Section 3; page 10 *	10,12	
	* figure 1 *		
Y	----- BOUTIN C ET AL: "Surface modified single molecules free-diffusion evidenced by fluorescence correlation spectroscopy" JOURNAL OF FLUORESCENCE NOVEMBER 2008 SPRINGER NEW YORK LLC US, vol. 18, no. 6, novembre 2008 (2008-11), pages 1115-1122, XP002586046 DOI: DOI:10.1007/S10895-008-0361-Y * page 1116, colonne de droite, alinéa 1; figure 1 *	9	

A	US 2009/142791 A1 (RODRIGUES ROGERIO GERALDES [US]) 4 juin 2009 (2009-06-04) * le document en entier *	1-12	

Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 juin 2010		Verdoodt, Erik	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

