

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 873 815

②① N° d'enregistrement national : **04 08520**

⑤① Int Cl⁸ : G 01 N 21/76 (2006.01)

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 02.08.04.

③① Priorité :

⑦① Demandeur(s) : *INODIAG Société anonyme* — FR.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 03.02.06 Bulletin 06/05.

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

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦② Inventeur(s) : DELAAGE MICHEL, NICOLAI
GILLES, DECAUDIN JEAN MICHEL et HUGUET
CHANTOME PASCAL.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BECKER ET ASSOCIES.

⑤④ DISPOSITIF DE LECTURE POUR LAMES PORTANT DES MICRO DEPOTS SUPPORTS DE REACTION
BIOLOGIQUE.

⑤⑦ La présente demande concerne un dispositif de lecture de lames portant des dépôts fluorescents, tels qu'utilisés en sérologie ou en analyse de biologie moléculaire. Elle concerne également tout appareil comprenant un tel dispositif, les logiciels spécifiques de mise en oeuvre, ainsi que l'utilisation de ces appareils et/ou dispositifs dans des procédés d'analyse ou de diagnostic.

FR 2 873 815 - A1



Dispositif de lecture pour lames portant des micro dépôts supports de réaction biologique

La présente demande concerne un dispositif de lecture de lames portant des
5 dépôts fluorescents, tels qu'utilisés en sérologie ou en analyse de biologie moléculaire.
Elle concerne également tout appareil comprenant un tel dispositif, les logiciels
spécifiques de mise en œuvre, ainsi que l'utilisation de ces appareils et/ou dispositifs dans
des procédés d'analyse ou de diagnostic.

10 **Arrière Plan de l'Invention**

Depuis quelques années, sont apparus des dispositifs de test multiples sur lames
de microscope, ou plus généralement sur support plan, où une série de dépôts sont
alignés, qui sont les supports d'une réaction biochimique lors du contact avec un
15 échantillon biologique. Après une éventuelle réaction par des révélateurs fluorescents, on
doit procéder à la lecture du dispositif, c'est-à-dire à la quantification de la réaction sur
chaque spot.

Les lames peuvent être en verre ou en matière plastique transparente. Le nombre
20 de spots sur une lame peut aller de quelques unités à plusieurs milliers. Le diamètre des
spots est généralement compris entre 50 et 250 microns. Ces dépôts sont généralement
désignés sous le nom de microarrays, terme américain qui s'est imposé au plan
international.

25 Selon une première variante, les dépôts sont constitués de séquences d'acides
nucléiques (ADN, acide désoxyribonucléiques) et l'échantillon biologique à tester
contient un mélange de séquences d'acides nucléiques, par exemple les formes amplifiées
de ses ARN (acide ribonucléique) messagers appelées ADN complémentaires (ADNc).
Chaque dépôt hybride l'ADNc qui lui correspond. La réaction d'hybridation peut être
30 visualisée et quantifiée par fluorescence, soit que les ADNc soient eux-même marqués,
soit que l'on marque les zones d'hybridation par un colorant spécifique.

Dans une seconde variante (telle que par exemple les tests sérologiques), l'échantillon biologique à tester contient un sérum ou un plasma, et réagit avec une lame portant des éléments réactifs, par exemple des protéines, cellules, fractions sub-cellulaires, bactéries, virus, etc., déposés au préalable sur la lame. Après cette première
5 réaction, la lame est mise en contact avec un réactif révélateur.

Dans tous les cas, on est confronté à une opération de lecture du signal propre à chaque dépôt. Ce signal peut être une radioactivité, une réaction colorée résultant d'une amplification enzymatique, ou encore un signal de fluorescence. C'est dans ce dernier cas
10 que l'on peut atteindre la résolution exigée par la densité de plus en plus grande des dépôts.

Tandis que les méthodes de dépôt se perfectionnent et l'utilité des mesures multiples se confirme, avec plusieurs applications possibles dans le domaine du
15 diagnostic, on ne dispose pas de lecteur de fluorescence ayant les performances requises à un coût acceptable pour un laboratoire d'analyse médicale. C'est dans cette dernière catégorie que se situe la présente invention.

Les appareils disponibles actuellement utilisent un balayage laser pour sonder la
20 lame. En général, trois lasers différents sont nécessaires pour obtenir les différents signaux issus des spots. Ensuite, l'image est reconstituée sur un écran et l'opérateur déplace visuellement une grille de cadrage, en s'efforçant de faire coïncider les mailles de la grille avec les images des dépôts. Cette opération est loin d'être parfaitement satisfaisante car les dépôts sont irréguliers. De tels appareils sont évidemment très
25 coûteux, de l'ordre de 100 000 US \$. Ils sont conçus pour la recherche où l'on traite un petit nombre de lames portant un très grand nombre de dépôts et ne sont pas adaptés au travail de routine d'un laboratoire d'analyse médicale, où l'on traite de nombreuses lames portant un nombre limité de dépôts.

30 Il existe donc un besoin réel de dispositifs d'analyse de microarrays sur lames permettant une analyse rapide, fiable et automatisée. Dans le domaine sérologique, il y a en particulier un besoin non satisfait de lecteur de lame à accès aléatoire, qui puisse

traiter une lame dans des délais courts (typiquement en quelques secondes), et répondre au diagnostic d'urgence en matière de maladies infectieuses. La présente invention apporte une solution à ces besoins.

5 **Résumé de l'Invention**

La présente demande concerne un dispositif de lecture de fluorescence pour lames de sérologie ou d'hybridation de biologie moléculaire. Elle concerne également tout appareil comprenant un tel dispositif, ainsi que l'utilisation de ces appareils et/ou dispositifs dans des procédés d'analyse ou de diagnostic. Dans ce qui suit les termes "éclairage" et "éclairement" sont synonymes. Ils font référence à la lumière excitatrice de la fluorescence.

L'objet de la présente invention est notamment de fournir un dispositif de lecture pour lames de sérologie ou d'hybridation de biologie moléculaire qui évite les inconvénients mentionnés précédemment, en assurant l'enregistrement et le traitement des signaux de fluorescence, de manière fiable et automatique. Une caractéristique particulière des dispositifs de l'invention réside notamment dans l'utilisation de diodes électroluminescentes pour fournir une lumière excitatrice canalisée, et dans l'agencement de la source d'excitation et de l'optique de reprise, donnant une grande fiabilité à la lecture et à l'analyse.

Un objet particulier de l'invention réside ainsi dans un dispositif de lecture et/ou d'analyse de lames comportant une zone réactive portant des micro dépôts d'éléments réactifs, ledit dispositif comprenant des moyens de mise en place d'une lame, des moyens d'éclairement de la zone réactive et une optique de reprise, caractérisé en ce que :

- les moyens d'éclairement de la zone réactive comprennent des diodes électroluminescentes (LED) agencées en canaux pour permettre un éclairage de manière oblique par rapport à l'axe optique, c'est-à-dire l'axe selon lequel la lumière fluorescente émise par les micro dépôts est captée par l'optique de reprise;
- le dispositif comprend au moins deux canaux de diodes émettant chacun une lumière d'excitation propre; et

- l'optique de reprise comporte un objectif formant l'image des micro dépôts sur un capteur.

De manière avantageuse,

- 5 - l'axe des canaux de diodes est oblique par rapport à l'axe optique avec un angle supérieur ou égal à 15°; et de préférence supérieur ou égal à 20° et/ou ;
- le dispositif comprend au moins deux diodes, chaque diode émettant une lumière d'éclairement propre ayant une longueur d'onde dans le proche UV ou dans le visible, les longueurs d'onde étant suffisamment écartées pour permettre l'excitation
- 10 sélective des molécules fluorescentes; de préférence, les longueurs d'onde d'excitation sont écartées d'intervalles égaux ou supérieurs à 100 nm ; et/ou
- la lumière d'éclairement émise par chacune des diodes suit une direction distincte; et/ou
- le dispositif comprend des éléments homogénéisant l'éclairement de la zone des
- 15 dépôts sur la lame; et/ou
- chaque canal comporte successivement au moins une diode, une optique de collimation, un filtre destiné à restreindre le spectre de la lumière excitatrice émise par cette diode et, éventuellement, un dispositif optique destiné à uniformiser la répartition spatiale de la lumière et/ou un condenseur orientant la lumière vers la zone réactive de la
- 20 lame; et/ou
- l'optique de reprise comporte un premier objectif dont un foyer coïncide avec la zone réactive de la lame, un porte filtres, de préférence un carrousel de filtres, et un deuxième objectif formant l'image; et/ou
- le dispositif comporte en outre une embase solide et/ou une console, assurant le
- 25 maintien ensemble des moyens de mise en place de lame, des moyens d'éclairement de la zone réactive et de l'optique de reprise.

Dans des modes de réalisation particulièrement préférés de l'invention:

- Le dispositif est commandé ou exploité par un logiciel dédié, typiquement qui
- 30 corrige le signal pour toutes les causes de perturbations : aléas de dépôt, irrégularités d'éclairement et variations dans la qualité des réactifs fluorescents. De préférence, le logiciel est capable d'effectuer des comparaisons des niveaux de fluorescence d'un même

dépôt à différentes longueurs d'onde et de dépôts différents à la même longueur d'onde. De préférence, le logiciel utilise des images pré-enregistrées de surfaces uniformes, fluorescentes ou simplement diffusantes, pour calculer une correction fine de la fluorescence des dépôts aux différentes longueurs d'onde ; et/ou

5 - le dispositif comporte trois canaux de lumière excitatrice dont les longueurs d'onde sont suffisamment écartées pour permettre l'excitation sélective de colorants différents ; de préférence, il comprend trois canaux de lumière excitatrice, l'un centré autour de 380 nm, le deuxième autour de 470 nm, le troisième autour de 594 nm ; et/ou

10 - le dispositif d'uniformisation de la lumière excitatrice est un guide optique de diamètre adapté pour permettre des réflexions multiples de la lumière, ou encore un dispositif de type Köhler. De préférence, le dispositif homogénéisant l'éclairement est de type Köhler; et/ou

 - Lorsque le support est une lame de microscope, ou tout autre support à faces parallèles, la lumière excitatrice atteint l'échantillon à travers la lame; et/ou

15 - L'objectif de l'optique de reprise côté capteur présente une distance focale égale ou inférieure à celle de l'objectif côté objet, réalisant un grandissement égal ou inférieur à 1; et/ou

 - Le carousel à filtres est motorisé et couplé au changement de la longueur d'onde d'excitation; et/ou

20 - l'optique de reprise forme l'image des dépôts sur un capteur CDD ("Charge Coupled Device") ; et/ou

 - le dispositif comporte un lecteur d'identifiant de lames; et/ou

 - le dispositif comporte un dispositif d'alimentation automatique en lames.

25 Ces caractéristiques sont particulièrement avantageuses et permettent la mise en contact des éléments réactifs de manière fiable et automatique, conduisant à des résultats reproductibles.

30 Un autre objet de l'invention concerne un procédé d'analyse sérologique comprenant l'incubation d'une lame de sérologie comprenant une zone réactive comportant une série de dépôts d'agents biologiques, par exemple infectieux, pathogènes, allergènes ou autoantigènes, avec un échantillon de sérum d'un patient, ou une dilution de

celui-ci, puis la révélation des anticorps (par exemple IgG et/ou IgM) de l'échantillon fixés sur les dépôts au moyen de réactifs marqués, caractérisé en ce que la lecture et l'analyse du marquage (e.g., de la fluorescence) sont réalisées au moyen d'un dispositif tel que défini précédemment. De préférence, le procédé d'analyse comporte trois longueurs d'onde d'analyse, excitant sélectivement trois colorants: le premier associé aux dépôts, 5 préalablement à la réaction sérologique, le second associé au révélateur des immunoglobulines de type G et le troisième associé au révélateur des immunoglobulines de type M. Dans un mode de réalisation préféré, le colorant associé aux dépôt est excitable autour de 380 nm, le colorant associé au révélateur des immunoglobulines de 10 type G est excitable autour de 470 nm et le colorant associé au révélateur des immunoglobulines de type M est excitable autour de 594 nm.

Un autre objet de l'invention sont les fonctionnalités du logiciel qui réalise l'analyse et qui comprend de préférence :

- 15 - les trois prises de vues digitales aux trois longueurs d'onde, correspondant respectivement à la fluorescence 1 témoin de la quantité déposée, la fluorescence 2 mesurant les immunoglobulines de type G et la fluorescence 3 mesurant les immunoglobulines du type M ;et/ou
- La normalisation de la fluorescence par rapport aux aléas du dépôt, à 20 l'inhomogénéité de l'éclairement et aux variations des réactifs de révélation ; et/ou
- La comparaison du signal par rapport à une échelle de positivité basée sur des sérum de contrôle.

L'invention concerne donc un support comprenant un logiciel pour la mise en 25 œuvre d'un dispositif selon la présente invention, mettant en œuvre les formules de l'exemple 3.

L'invention concerne également l'utilisation d'un dispositif tel que défini précédemment pour l'analyse sérologique ou en biologie moléculaire. De préférence, 30 l'analyse en biologie moléculaire comporte l'analyse des acides ribonucléique ou desoxyribonucléiques d'un échantillon biologique en biologie moléculaire. Dans ce cas, la lame de verre porte par exemple des dépôts d'ADN simple brin, destiné à capter les

ADNc fluorescents provenant de l'échantillon. Par exemple, les longueurs d'onde d'excitations peuvent être choisies dans le voisinage de 543 nm pour les marquages endogènes avec la cyanine 3, dans le voisinage de 635 nm pour les marquages avec cyanine 5, dans le voisinage de 488 nm pour les marquages des parties hybridées avec Sybr Green ®(Molecular Probes, Eugene, Oregon). La liste n'est pas limitative.

Un autre aspect de l'invention concerne des kits, notamment d'analyse biologique, comprenant l'utilisation d'un dispositif tel que défini précédemment.

L'invention est applicable dans de nombreux domaines, notamment pour l'analyse histologique ou sérologique dans un contexte médical, vétérinaire, environnemental, agro-alimentaire, etc.

Description détaillée de l'invention

15

Comme indiqué précédemment, l'invention porte sur un dispositif adapté à l'analyse de lames. Les principaux éléments constitutifs sont présentés sur la figure 1. Le dispositif comporte avantageusement une embase solide (1) portant une console (2) ayant pour but de maintenir le positionnement des différents éléments les uns par rapport aux autres.

20

Chaque diode électroluminescente (3) est enfermée dans un étui (4) contenant le dispositif d'homogénéisation, l'ensemble constituant un canal d'éclairage emboîté dans un support (5) sur lequel est fixé la chambre porte lame (6). Au dessus de celle-ci est vissé le premier objectif (7) qui est lui-même emboîté dans un manchon solidaire de l'étui du carrousel à filtres (8). Symétriquement, au dessus du carrousel, on trouve le deuxième objectif (9) vissé sur la caméra CCD (10). L'allumage des diodes, le positionnement du porte-filtre et la mise en route de la caméra sont pilotés par un micro-ordinateur, qui par ailleurs contient le logiciel d'interprétation selon l'invention.

25
30

Les diodes électroluminescentes possèdent de préférence une puissance électrique comprise entre 500 et 5000 mW. Devant les diodes, on place un jeu de lentilles

convergentes afin de donner au faisceau lumineux un parallélisme approximatif. Une divergence de moins de 10 degrés est préférée. Puis on place un filtre propre à restreindre la fenêtre spectrale de la lumière excitatrice. Une valeur préférée de la fenêtre est un intervalle égal ou inférieur à 40 nm.

5

Dans un mode de réalisation préféré, les longueurs d'onde excitatrices sont écartées les unes des autres, l'une dans le proche UV, une seconde dans le bleu, une troisième dans le jaune, l'orangé ou le rouge. Une valeur préférée de l'écart entre les longueurs d'onde excitatrices est un intervalle égal ou supérieur à 100 nm.

10

Dans un mode de réalisation préféré, le dispositif d'homogénéisation est constitué par une surface dépolie à l'entrée d'un guide optique mélangeur constitué d'un tube de matière transparente à fort indice de réfraction d'une longueur comprise entre 20 et 40 mm de préférence, et d'un diamètre compris entre 6 et 10 mm de préférence. Dans ce cas, une lentille d'entrée concentre le faisceau avec un angle convenable. (figure 2)

15

Dans un autre mode de réalisation préféré, le dispositif d'homogénéisation est constitué par une surface dépolie, placée au foyer d'une lentille de collimation dont on forme l'image sur l'objet (montage dit de Köhler). (figure 3)

20

Dans un mode de réalisation particulier, la lame à mesurer est enchâssée dans un support amovible qui est lui-même glissé dans une fente. Le support est muni d'une ouverture au droit de la zone active de la lame. Un dispositif de blocage, tel qu'une butée à bille immobilise le dit support dans la position où sa fenêtre est dans l'axe optique.

25

Dans un mode de réalisation préféré, la lame à mesurer est directement introduite dans le dispositif au travers d'une fente et positionnée par des appuis sur glissières, et ressorts sur la face opposée. Dans un mode de réalisation préféré, la lame est munie d'un détrompeur, par exemple une échancrure sur un angle, qui prévient une introduction erronée.

30

Les étuis porte diode et le logement de la lame constituent avantageusement un ensemble rigide qui peut être réalisé à partir de matériaux variés, éventuellement mélangés. Il peut en particulier être composé (ou à base de) de matériau plastique, de métal et/ou de tout matériau rigide à des températures de 37°C ou plus. Dans un mode de mise en œuvre préféré, le bloc est composé de nylon (delrin, rilsan) noir ou d'alliage d'aluminium anodisé ou peint pour éviter les reflets.

Dans un mode de réalisation préféré, le logement de la lame, ou le porte lame amovible sont réalisés en métal pour éviter toute déformation préjudiciable au maintien de la mise au point.

Dans un mode de réalisation préféré, les objectifs ont une distance focale comprise entre 20 et 40 mm. Dans un autre mode de réalisation préféré, l'objectif côté caméra a une distance focale inférieure à celle de l'objectif côté objet. Ainsi, une réduction est opérée qui augmente la capacité de capter en une seule image un nombre plus élevés de dépôts.

Le capteur CCD peut être celui d'un appareil de photographie numérique tels que « CoolPix » de Nikon, ou de manière préférée sur une Caméra telle que Hamamatsu 5885, Q-Imaging Qicam, Sony SVS, ou de toute autre marque. Il n'est pas nécessaire d'avoir un nombre élevé de pixels, ni de refroidir le capteur, l'orientation oblique de la lumière excitatrice assurant un excellent rapport signal/bruit.

Dans un mode de réalisation possible, l'axe optique est horizontal. Dans un mode de réalisation préféré, il est vertical.

Dans un mode de mise en œuvre préféré du dispositif de l'invention, la lame fait saillie de la fente de mesure et permet la lecture d'un code à barre ou d'une étiquette électronique. Le dispositif selon l'invention comprend donc un lecteur de code barre ou une antenne de communication avec l'étiquette électronique. Ainsi, un objet particulier de la présente invention concerne des lames munies d'étiquettes électroniques sur

lesquelles les caractéristiques de la lecture et les résultats de la lecture peuvent être enregistrées.

Ainsi, un objet particulier de la présente invention concerne l'algorithme de
5 lecture propre aux lames de sérologie. Trois images sont enregistrées, avec trois
fluorescences différentes. La première image, qui concerne un marqueur de fluorescence
systématiquement attaché au dépôt au moment de la fabrication des lames, est analysée
en termes de « clusters », c'est-à-dire d'éléments connexes, qui sont les dépôts.
L'avantage de procéder ainsi est qu'il n'y a pas à positionner une grille sur l'image des
10 dépôts, ce qui serait de toute manière imprécis du fait des distorsions inévitables de
l'optique. On est également affranchi du jeu dans les glissières du logement de la lame et
une analyse automatique devient possible. Les deux autres images, correspondant à deux
autres marqueurs fluorescents, sont associées respectivement aux réponses
immunoglobuline G et immunoglobuline M du patient. Les micro dépôts étant entachés
15 d'une grande incertitude quant à leur quantité, c'est un élément de l'invention d'utiliser
l'un des marqueurs fluorescents comme témoin de la quantité de matière déposée et
d'utiliser le signal correspondant pour corriger les signaux représentatifs de la réaction
sérologique. C'est un autre élément de l'invention d'utiliser des images d'une lame
portant un élément diffusant pour mesurer les différences locales d'éclairement et ensuite
20 utiliser ces résultats pour corriger la fluorescence des dépôts pour les irrégularités de
l'éclairement. C'est un autre élément de l'invention que de rapporter la fluorescence
associée aux anticorps d'un sujet s'étant fixé sur un dépôt d'antigène, à celle d'un dépôt
de référence d'immunoglobulines pure, respectivement de type G ou de type M, rendu
fluorescent par le même révélateur fluorescent anti IgG et anti IgM respectivement. Cela
25 se comprendra mieux dans l'exemple 3.

Dans un mode de réalisation préféré, le dispositif de l'invention comporte en outre
un moyen pour assurer un déplacement de la lame perpendiculairement à l'axe optique
pour pouvoir ainsi réaliser des images de différentes zones de la lame et aussi pouvoir
30 mesurer un nombre accru de dépôts. Selon ce mode, jusqu'à 40 000 dépôts seraient
lisibles, ce nombre étant un ordre de grandeur, et pouvant être dépassé selon les
techniques de dépôts et le nombre de pixels du capteur.

Dans un autre mode de réalisation, on utilise un dispositif d'alimentation automatique en lames comportant un magasin à lames, un dispositif de lecture de l'identifiant et une mécanique de transfert à travers le dispositif de lecture.

5

Les dispositifs selon l'invention sont adaptés à tout type de lame de microscope. Dans ce contexte, au sens de la présente demande, on entend par "lame" tout élément rigide porte-objet pouvant être utilisé pour immobiliser un dépôt biologique, délimitant ainsi une zone réactive. Il peut s'agir par exemple d'une lamelle solide, d'une membrane, d'un filtre, etc. La lame peut être réalisée en (ou à base de) tout matériau connu et conventionnel, comme du plastique, verre, nylon, des polymères biologiques, de la silice, etc. Des lames préférées sont des lames porte-objet de microscopie en verre. Leurs dimensions sont généralement standard, soit environ 25mm x 75mm. Dans un mode de réalisation préféré, les lames sont munies d'un détrompeur, par exemple sous la forme d'une encoche dans un coin.

15

D'une manière particulièrement avantageuse, dans le dispositif de l'invention, la lame (ou les microarrays) utilisée pour le diagnostic ne comprend pas plus de 400 dépôts, par exemple, ce qui permet d'en former l'image de fluorescence en une seule prise de vue. Comme indiqué ci-dessus, la mise en place de la lame peut s'effectuer soit par un support, soit en glissant la lame dans une fente. Cette fente ménagée dans un matériau noir, est munie de lamages évitant de détériorer les dépôts lors d'une introduction, même erronée.

20

Différents mode de réalisation et d'utilisation de l'invention sont décrits dans les exemples et dans les figures annexées, dans lesquelles:

25

La Figure 1 est un schéma général d'un dispositif conforme à l'invention.

La Figure 2 est un schéma d'un canal d'éclairage à diode de type à guide mélangeur.

30

La figure 3 est un schéma d'un canal d'éclairage à diode avec un éclairage de type Köhler.

La Figure 4 représente un écran de contrôle de la séquence d'acquisition.

La Figure 5 représente la feuille de résultats correspondant à la figure 4. Les fluorescences des témoins IgG et IgM sont arbitrairement normalisées à 10 000.

Comme illustré sur les figures, l'invention peut être mise en œuvre pour l'analyse
5 de lames de sérologie. Dans le mode sérologique, la lame porte une série de dépôts biologiques ("spots"), par exemple d'agents infectieux, pathogènes, d'autoantigènes ou d'allergènes. Les dépôts sont soigneusement repérés, ce repérage constituant un code d'identification. L'échantillon liquide à tester est un sérum de patient, généralement dilué dans un tampon approprié. Le traitement de la lame peut être effectué par des moyens
10 manuels, consistant en trempage dans des bains successifs, ou par des moyens automatiques tels que décrits dans la demande de brevet FR0403365.

L'invention peut également être mise en œuvre pour l'analyse de biologie moléculaire, soit en mode fluorescence, comme précédemment décrit, soit en mode
15 densité optique. Dans ce dernier cas, les lames portent un support de nylon sur lequel sont déposés les spots, l'éclairage est diffusé par le nylon et les spots absorbent la lumière. Ils sont détectés et quantifiés comme taches sombres sur fond clair.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des
20 exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Exemple 1 - Description d'un dispositif selon l'invention

Ce mode de mise en œuvre est décrit en relation avec la Figure n°1.
25 Les diodes électroluminescentes sont :
Nichia-NCCU001 pour l'excitation UV, associée au filtre Semrock FF 409-Ex02 ;
Lumileds LXHL –MB1D pour l'excitation à 470 nm, associée au filtre Semrock FF 506-Ex03 A ;
30 Lumileds LXHL –ML1D pour l'excitation à 594 nm, associée au filtre Chroma Technologies HQ590/40.

Le dispositif d'homogénéisation est du type à guide de lumière.

Le porte lame est réalisé en Delrin noir.

L'optique de reprise comprend :

- un objectif Fujinon $f=25$ mm réglé à l'infini ;
- trois filtres : Semrock FF 409-Em02-B, Semrock FF 506-Em02-B et Chroma

5 HQ655/40 montés dans un porte filtre linéaire en aluminium anodisé noir ;

- un objectif Fujinon $f=25$ mm réglé à l'infini.

L'image est projetée sur le capteur d'une caméra SVS Vistek SV084 « S » comportant 658x494 pixels.

L'ensemble est piloté par un micro-ordinateur portant un logiciel de pilotage, de
10 lecture et d'analyse selon l'invention.

Exemple 2 - Description d'une analyse selon l'invention

Une lame de sérologie porte 12 dépôts, arrangés en 3 lignes et 4 colonnes au pas
15 de 0,5 mm. Les deux premiers dépôts de la première ligne sont des témoins d'immunoglobulines IgG et IgM respectivement. Les autres dépôts sont des agents infectieux.

Avant toute incubation, tous les dépôts fluorescent dans le bleu, excitation 380
20 nm. La lame est d'abord incubée trente minutes avec le sérum du patient. Ensuite, après un rinçage, la lame est incubée dix minutes avec les réactifs anticorps secondaires qui sont un anticorps de chèvre anti immunoglobuline G humaine marquée à la fluorescéine, et un anticorps de chèvre anti immunoglobuline M humaine marquée au Texas red, en mélange. Les dépôts ayant fixé des IgG ont une fluorescence verte excitable à 470 nm et
25 les dépôts contenant des IgM ont une fluorescence rouge excitable à 594. Seule l'image excitée à 380 nm est présentée (figure 4).

Exemple 3 –Traitement du signal selon l'invention

L'algorithme vise à corriger la fluorescence des spots : des aléas des dépôts, des
30 irrégularités d'éclairement, et des réactifs.

Notation

S_i : surface du spot i ;

l'indice i varie de 1 à n , nombre des spots ;

la valeur $i=g$ est associée au spot témoin IgG, la valeur $i=m$ est associée au spot témoin IgM.

5 F_{ij} : fluorescence du spot i à la longueur d'onde j , fond déjà soustrait,

$j = 1$ éclairage UV (référence)

$j = 2$ éclairage 470

$j = 3$ éclairage 594

E_{ij} : éclairement de la surface S_i à la longueur d'onde j

10 z_{i2} et z_{i3} sont appelés fluorescences relatives. Elles sont utilisées pour quantifier les teneurs de l'échantillon en anticorps IgG et IgM respectivement, spécifiques de l'antigène i .

$z_{i2} = \frac{F_{i2} E_{i1} F_{g1} E_{g2}}{F_{i1} E_{i2} F_{g2} E_{g1}}$	pour les taux d'IgG ($j = 2$)
$z_{i3} = \frac{F_{i3} E_{i1} F_{m1} E_{m3}}{F_{i1} E_{i3} F_{m3} E_{m1}}$	pour les taux d'IgM ($j = 3$)

15 Les fluorescences relatives, par exemple z_{i2} , ont bien les propriétés attendues. En effet :

- Toutes choses égales par ailleurs, taille des spots, éclairement, réactifs fluorescents, la fluorescence relative z_{i2} est proportionnelle au signal spécifique F_{i2} qui représente l'intensité de la réaction sérologique, ou de la réaction d'hybridation.

20

- Les surfaces ne figurent pas dans l'expression de z_{i2} , elle ne dépend donc pas du plus ou moins grand étalement du dépôt sur la lame.

- Elle ne dépend pas de la quantité du dépôt, qui fait varier dans le même rapport

25 F_{i2} et F_{i1} par exemple, au numérateur et au dénominateur.

- Elle ne dépend pas de l'intensité de l'éclairement dans la zone du dépôt, qui fait varier dans le même rapport F_{i2} et E_{i2} car la fluorescence d'une surface est proportionnelle à son éclairement.

30

- Elle ne dépend pas de la qualité du réactif qui fait varier dans le même rapport F_{i2} et F_{g2} .

La même analyse prévaut pour la fluorescence relative z_{i3} . Les résultats
5 correspondant à l'exemple 3 sont présentés dans la figure 5

Revendications

1. Dispositif de lecture et/ou d'analyse de lames comportant une zone réactive portant des micro dépôts d'éléments réactifs, ledit dispositif comprenant des moyens de mise en place d'une lame, des moyens d'éclairement de la zone réactive et une optique de reprise, caractérisé en ce que :
- les moyens d'éclairement de la zone réactive comprennent des diodes électroluminescentes agencées en canaux pour permettre un éclairage de manière oblique par rapport à l'axe optique, c'est-à-dire l'axe selon lequel la lumière fluorescente émise par les micro dépôts est captée par l'optique de reprise ;
 - le dispositif comprend au moins deux canaux de diodes émettant chacun une lumière d'excitation propre; et
 - l'optique de reprise comporte un objectif formant l'image des micro dépôts sur un capteur.
2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'axe du canal d'éclairage est oblique par rapport à l'axe optique avec un angle supérieur ou égal à 15°.
3. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'axe du canal d'éclairage est oblique par rapport à l'axe optique avec un angle supérieur ou égal à 20°.
4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux diodes, chaque diode émettant une lumière d'éclairage propre ayant une longueur d'onde dans le proche UV ou le visible, les longueurs d'onde étant suffisamment écartées pour permettre l'excitation sélective des molécules fluorescentes.
5. Dispositif selon la revendication 4, caractérisé en ce que les longueurs d'onde d'excitation sont écartées d'intervalles égaux ou supérieurs à 100 nm.
6. Dispositif selon la revendication 4, caractérisé en ce que la lumière d'éclairage émise par chacune des diodes suit une direction distincte.

7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend des éléments homogénéisant l'éclairement de la zone des dépôts sur la lame.
- 5
8. Dispositif selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif homogénéisant l'éclairement de type Köhler.
9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que
- 10 chaque canal comporte successivement au moins une diode, un filtre destiné à restreindre le spectre de la lumière excitatrice émise par cette diode et, éventuellement, un dispositif optique destiné à uniformiser la répartition spatiale de la lumière et/ou un condenseur orientant la lumière vers la zone réactive de la lame.
- 15 10. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'optique de reprise forme l'image des dépôts sur un capteur CDD.
11. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'optique de reprise comporte un premier objectif dont un foyer coïncide avec la zone
- 20 réactive de la lame, un carousel de filtres et un deuxième objectif formant l'image.
12. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte en outre des moyens d'alimentation automatique de lames et, éventuellement, un lecteur d'identifiant de lames.
- 25
13. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une embase solide et/ou une console, assurant le maintien ensemble des moyens de mise en place de lame, des moyens d'éclairement de la zone réactive et de l'optique de reprise.

14. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend trois canaux de lumière excitatrice, l'un centré autour de 380 nm, le deuxième autour de 470 nm, le troisième autour de 594 nm.
- 5 15. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est exploité ou commandé par un logiciel capable d'effectuer des comparaisons des niveaux de fluorescence d'un même dépôt à différentes longueurs d'onde et de dépôts différents à la même longueur d'onde.
- 10 16. Dispositif selon la revendication 15, caractérisé en ce que le logiciel utilise des images pré-enregistrées de surfaces uniformes, fluorescentes ou simplement diffusantes, pour calculer une correction fine de la fluorescence des dépôts aux différentes longueurs d'onde.
- 15 17. Procédé d'analyse sérologique comprenant l'incubation d'une lame de sérologie comprenant une zone réactive comportant une série de dépôts d'agents biologiques, par exemple infectieux, pathogènes, allergènes ou autoantigènes, avec un échantillon de sérum d'un patient, ou une dilution de celui-ci, puis la révélation des anticorps de l'échantillon fixés sur les dépôts au moyen de réactifs marqués, caractérisé en ce que la
20 lecture et l'analyse du marquage sont réalisées au moyen d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 16.
18. Procédé d'analyse sérologique selon la revendication 16, comportant trois longueurs d'onde d'analyse, excitant sélectivement trois colorants: le premier associé aux dépôts,
25 préalablement à la réaction sérologique, le second associé au révélateur des immunoglobulines de type G et le troisième associé au révélateur des immunoglobulines de type M.
19. Procédé d'analyse sérologique selon la revendication 18, caractérisé en ce que le
30 colorant associé aux dépôt est excitable autour de 380 nm, le colorant associé au révélateur des immunoglobulines de type G est excitable autour de 470 nm et le colorant associé au révélateur des immunoglobulines de type M est excitable autour de 594 nm.

20. Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 pour l'analyse sérologique ou l'analyse des acides ribonucléiques ou desoxyribonucléiques d'un échantillon biologique en biologie moléculaire.

1/5

Figure 1

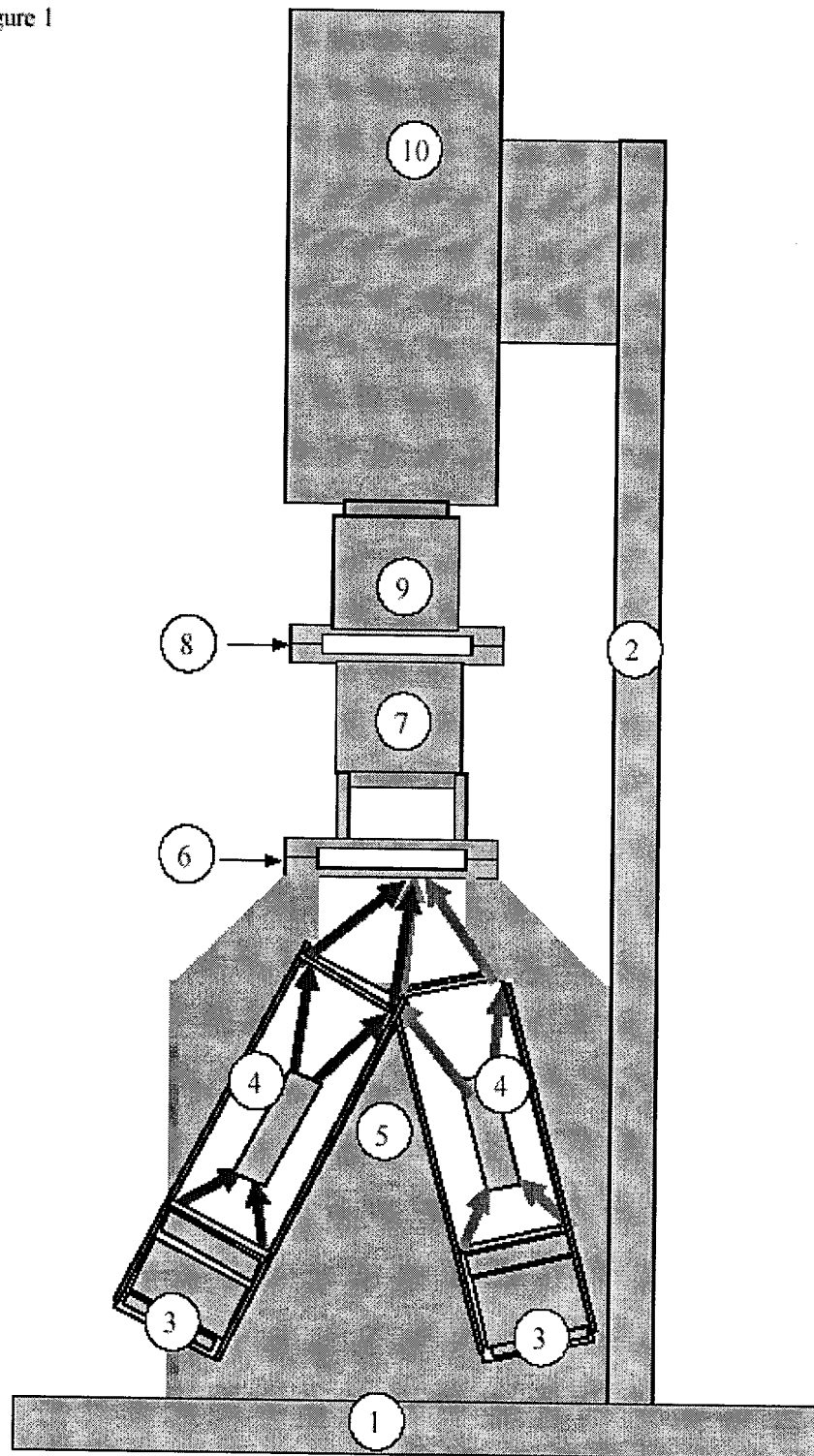
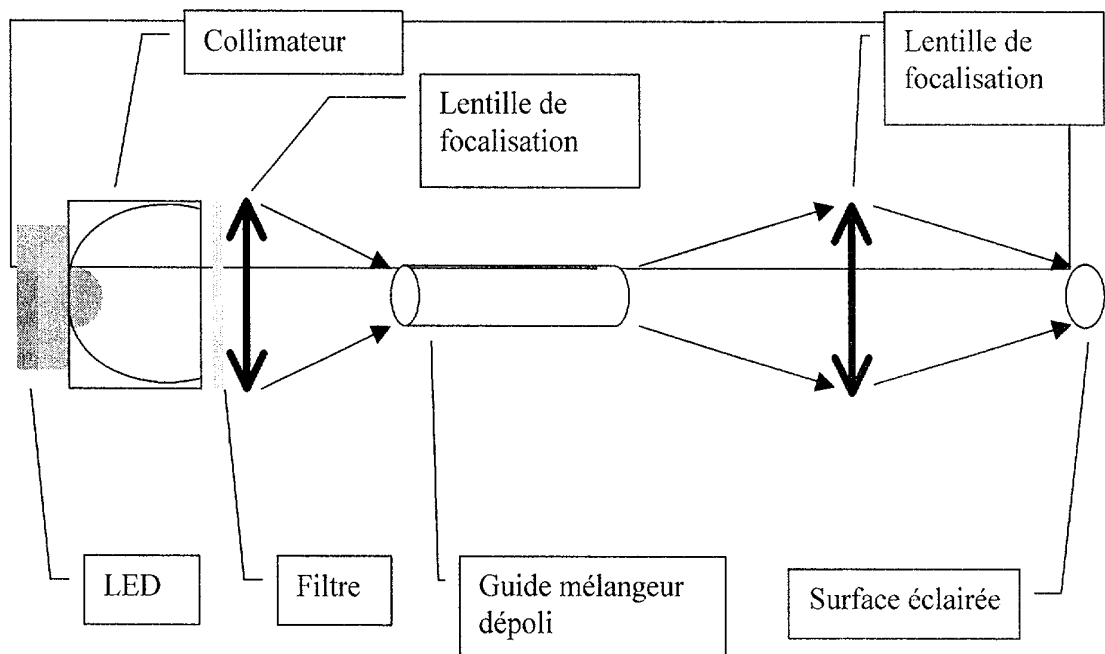


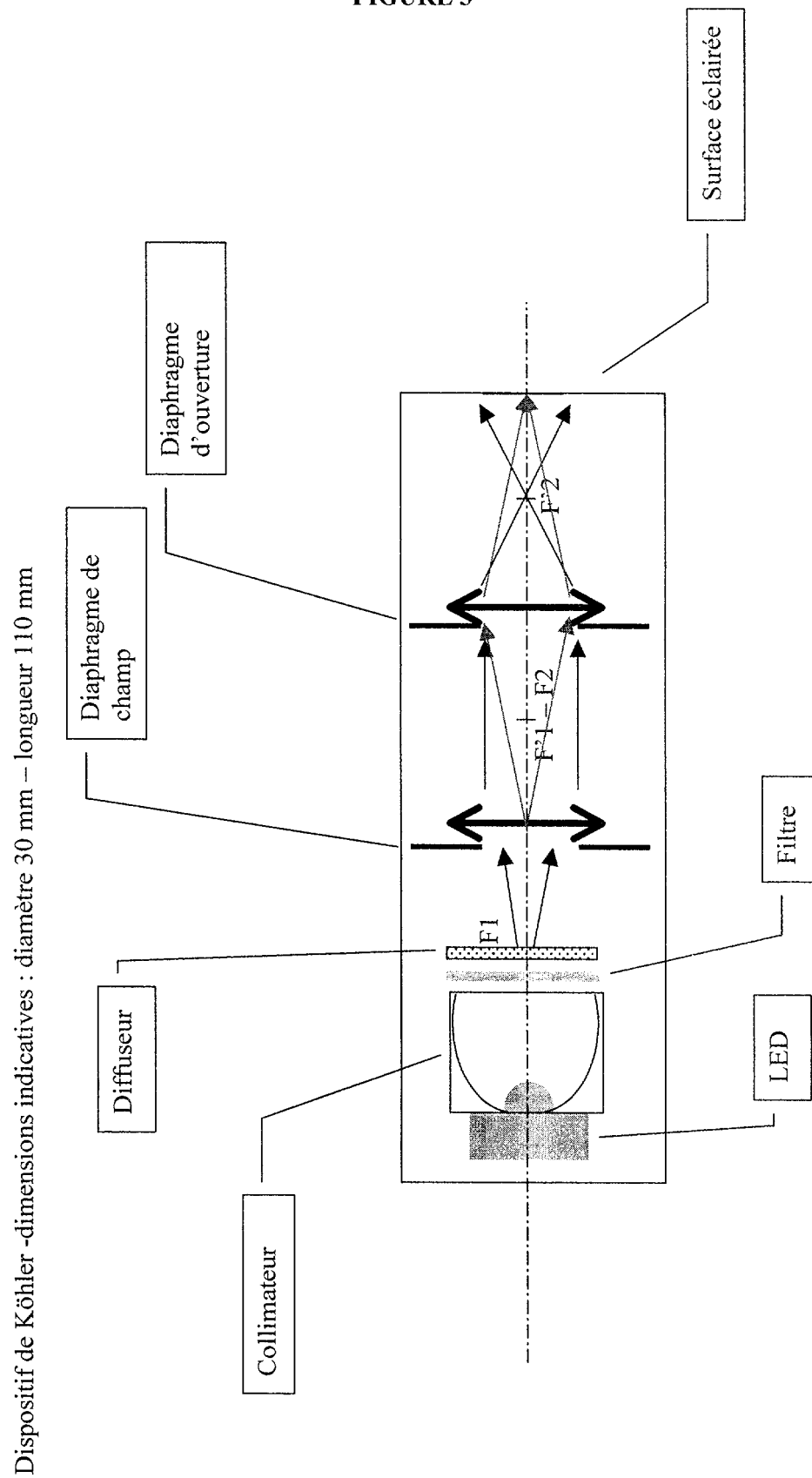
FIGURE 2

Dimensions indicatives : Diamètre 30 mm – Longueur 180 mm



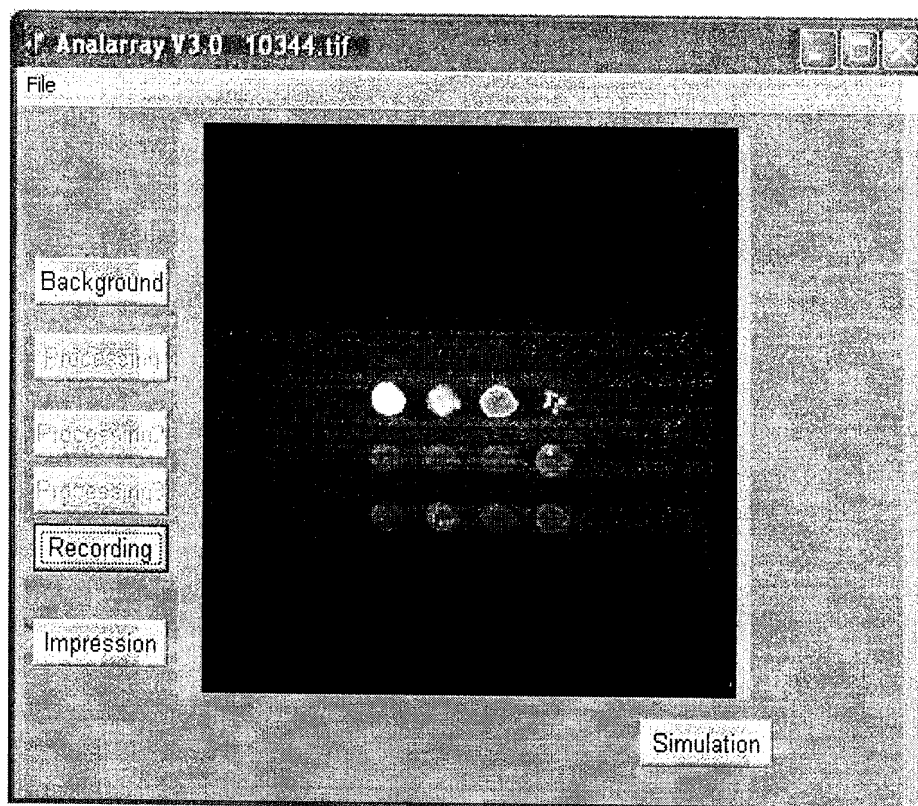
3/5

FIGURE 3



4/5

FIGURE 4



5/5

Figure 5 Feuille de résultats correspondant à la figure 4

INODIAG- Analarray8-V3

26/07/04

Echantillon 10344 largeur: 664 hauteur: 494
diamètre nominal 45

numéro	abscisse	ordonnée	surface	fluo365	fluo470	fluo594	Fluorescence relatives	
							zi2 IgG	zi3 IgM
1	230	236	1639	223300	54785	300	10000	82
2	229	305	956	17730	4808	350	11053	1202
3	229	373	1144	27595	5336	322	7881	710
4	298	237	1330	140214	2781	23018	808	10000
5	297	305	1028	21301	6200	374	11864	1068
6	296	373	1092	38968	7536	499	7882	781
7	367	238	1649	164389	86662	2938	21487	1089
8	366	305	1048	20001	4729	284	9637	865
9	366	374	1075	23924	6644	459	11319	1169
10	434	238	1133	76909	2950	1057	1564	837
11	434	306	1325	66973	7859	505	4783	459
12	433	375	1093	28379	6140	372	8819	798



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 655247
FR 0408520

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	US 6 542 241 B1 (THORWIRTH GUENTER ET AL) 1 avril 2003 (2003-04-01)	1,17	G01N21/76
A	* colonne 7, ligne 7 - colonne 8, ligne 52; figures 1,2 *	2-4,9-11	
A	----- WO 02/093144 A (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA; BLUMENFELD, MARTIN; SANDERS, M) 21 novembre 2002 (2002-11-21) * page 19, ligne 24 - page 21, ligne 18 * * page 28, ligne 2 - page 30, ligne 5 * * page 36, ligne 25 - page 38, ligne 19; figures 2,10,13 *	1,4,5, 10,11, 17-19	
A	----- US 5 854 684 A (STABILE ET AL) 29 décembre 1998 (1998-12-29) * colonne 2, ligne 63 - colonne 3, ligne 32 * * colonne 9, ligne 49 - colonne 10, ligne 34; figures 1A,1B,2 *	1-4,6, 10,13, 15,17	
A	----- US 2004/032589 A1 (BECHEM MARTIN [DE] ET AL) 19 février 2004 (2004-02-19) * alinéa [0040] - alinéa [0044]; figures 2,3 *	1,11,17	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) G01N
A	----- FR 2 845 488 A (TROPHOS) 9 avril 2004 (2004-04-09) * page 9, ligne 30 - page 10, ligne 19; figure 2 *	1,17	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 mars 2005		Stuebner, B	
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			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0408520 FA 655247**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **17-03-2005**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6542241 B1	01-04-2003	DE 19914279 C1	07-09-2000
WO 02093144 A	21-11-2002	WO 02093144 A1	21-11-2002
US 5854684 A	29-12-1998	AU 4607197 A	17-04-1998
		WO 9813683 A1	02-04-1998
US 2004032589 A1	19-02-2004	DE 10223438 A1	11-12-2003
		AU 2003245881 A1	12-12-2003
		WO 03100398 A1	04-12-2003
		EP 1511989 A1	09-03-2005
FR 2845488 A	09-04-2004	FR 2845488 A1	09-04-2004
		WO 2004034122 A2	22-04-2004