



(51) Classification internationale des brevets :
G01J 3/02 (2006.01) *G02B 21/08* (2006.01)
G01J 3/44 (2006.01) *G01N 21/65* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2016/066301

(22) Date de dépôt international :
8 juillet 2016 (08.07.2016)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
15 56460 8 juillet 2015 (08.07.2015) FR

(71) Déposant : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES [FR/FR]; 25 rue Leblanc, Bâtiment Le Ponant D, 75015 Paris (FR).

(72) Inventeurs : ALLIER, Cédric; 16 rue René Thomas, 38000 Grenoble (FR). STROLA, Samy; 1 quai des Allobroges, 38000 Grenoble (FR).

(74) Mandataire : CABINET NONY; 11 rue Saint-Georges, 75009 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : SPECTROSCOPY AND ESPECIALLY RAMAN SPECTROSCOPY DEVICE AND ASSOCIATED METHOD

(54) Titre : DISPOSITIF DE SPECTROSCOPIE, NOTAMMENT SPECTROSCOPIE RAMAN, ET PROCEDE ASSOCIE

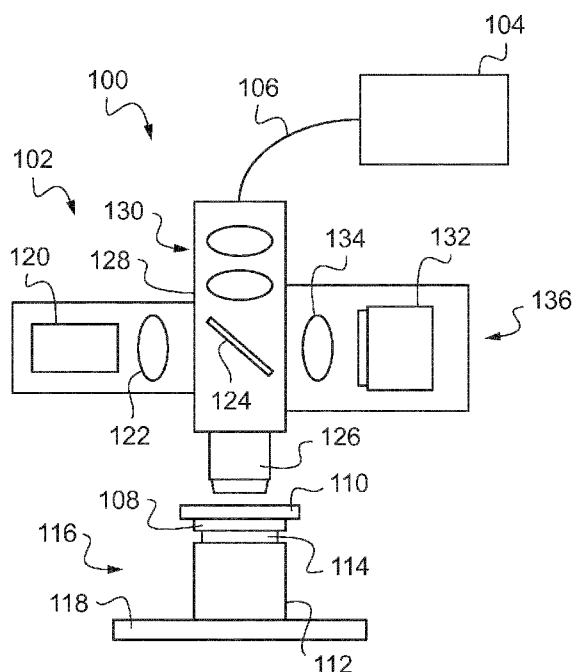


Fig.2

(57) Abstract : The subject of the invention is a spectroscopy device wherein an assembly integrating the sample holder (108), the source for illuminating the sample (110), which source is itself integrated into the sample holder, and the detector (light sensor, 112) is independent and movable with respect to a measuring assembly (136) integrating the elements for exciting the sample (120), preferably a laser, and the elements for collecting the light (126, 124, 134, 132, 106, 104). The invention also relates to the associated method. A use particularly targeted by the invention is the optical analysis by Raman spectroscopy of biopsies obtained from tissue samples, which are fastened to transparent substrates.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet un dispositif de spectroscopie dans lequel un ensemble intégrant le porte-échantillon (108), la source d'éclairage de l'échantillon (110) elle-même intégrée au porte-échantillon et le détecteur (capteur de lumière, 112)) est indépendant et mobile par rapport à un ensemble de mesure (136) intégrant les éléments d'excitation de l'échantillon (120), de préférence un laser, et les éléments de collecte de cette lumière (126, 124, 134, 132, 106, 104). L'invention concerne également le procédé associé. Une utilisation particulièrement visée par l'invention est l'analyse optique par spectroscopie Raman de biopsies issues de prélèvements tissulaires, qui sont fixées sur des substrats transparents.

DISPOSITIF DE SPECTROSCOPIE, NOTAMMENT SPECTROSCOPIE RAMAN, ET PROCEDE ASSOCIE

Domaine technique

5 L'invention concerne un dispositif de spectroscopie et un procédé mettant en œuvre un tel dispositif de spectroscopie.

Bien que décrite en référence à l'application principale visée, la spectroscopie Raman, le dispositif de spectroscopie selon l'invention peut être mis en œuvre pour faire des analyses spectrales différentes, par exemple, une spectroscopie infrarouge, une spectroscopie de fluorescence, etc... à la condition de modifier certains des éléments du dispositif, tels que la
10 source de lumière d'analyse, le spectromètre et/ou les éléments optiques.

Une utilisation particulièrement visée par l'invention est l'analyse optique par spectroscopie Raman de biopsies issues de prélèvements tissulaires, qui sont fixées sur des substrats transparents.

Art antérieur

15 La spectroscopie Raman, aussi appelée spectrométrie Raman, et la microspectroscopie Raman, sont des méthodes non destructives pour l'analyse de la composition et de la structure chimique moléculaire d'un matériau afin de le caractériser.

Elle exploite le phénomène physique selon lequel un milieu modifie la fréquence de la lumière y circulant. Ce décalage en fréquence correspond à un échange d'énergie entre le rayon
20 lumineux et le milieu, et donne des informations sur l'échantillon lui-même.

La spectroscopie Raman consiste ainsi à envoyer une lumière monochromatique sur l'échantillon et à analyser la lumière diffusée.

La figure 1 illustre, à titre d'exemple, un dispositif connu de spectroscopie de type Raman 10. Ce dispositif 10 comprend essentiellement un module d'analyse Raman 12, couplé à
25 un microscope 14 standard. Ce dispositif connue est parfois appelé « micro-Raman ».

Sur le microscope 14 est monté un porte-échantillon 16 destiné à porter l'échantillon à analyser.

Ce porte-échantillon 16 peut être déplacé par rapport au microscope 14 pour modifier la zone de visualisation de l'échantillon.

30 Le microscope 14 est également équipé d'une caméra vidéo 18 pour enregistrer les observations réalisées avec le microscope 14. Le microscope 14 comporte une ou plusieurs sources lumineuses, de sorte qu'il est possible d'observer en transmission ou en réflexion selon la nature de l'échantillon (transparent ou pas). Le microscope 14 comporte encore un système de lentilles optiques ou, mieux, plusieurs systèmes de lentilles optiques interchangeables couplé à

des objectifs pour modifier le grossissement avec lequel les observations de l'échantillon à analyser sont réalisées.

Par ailleurs, le microscope 14 est couplé optiquement au module d'analyse Raman 12.

Le module d'analyse Raman 12 comprend essentiellement une source lumineuse 20, ici un laser 20, pour émettre un faisceau lumineux afin de sonder l'échantillon.

Le microscope 14 est équipé de moyens tels qu'un ensemble constitué d'un miroir 22, d'une lame semi-réfléchissante, d'un filtre coupe-bande 24, et de lentilles de focalisation 26, par exemple, permettant de diriger le faisceau lumineux émis par le laser vers l'échantillon à analyser et pour diriger le faisceau lumineux émis en retour par l'échantillon à analyser vers le module d'analyse Raman 12.

Dans le filtre coupe-bande 24, le faisceau lumineux émis par l'échantillon est filtré pour supprimer la composante spectrale du faisceau lumineux correspondant à la fréquence propre d'émission du laser.

Le faisceau lumineux filtré traverse ensuite une fente 26 pour le focaliser, puis un dispositif diffractant 28. Le faisceau diffracté est finalement capté au moyen d'un capteur lumineux 30, ici un capteur CCD (pour « Charge-Coupled Device », ou « dispositif à transfert de charge »).

Dans les procédures standards d'analyse, les observations de l'échantillon sont faites:

- soit par imagerie en microscopie avec un éclairage en lumière blanche ;
- soit par l'imagerie Raman.

Une imagerie Raman implique nécessairement d'éteindre l'éclairage en lumière blanche, car le faisceau d'excitation et l'éclairage en lumière blanche utilisent le même chemin optique et donc l'utilisation de l'un exclut de fait celle de l'autre, ou au pire se perturbent mutuellement.

Le changement d'une imagerie à l'autre implique de fait un changement de focus qui peut conduire à des défaillances de performances dans les observations réalisées.

Avec un faible grossissement, typiquement 5 fois, les observations peuvent permettre d'observer l'ensemble de la surface de l'échantillon à analyser, typiquement de l'ordre de 1mm², pour déterminer les zones d'intérêt de l'échantillon. Cependant, un faible grossissement ne permet d'atteindre une résolution suffisante pour permettre d'atteindre les détails de l'échantillon, comme par exemple les cellules issues d'un prélèvement tissulaire.

Avec un grossissement plus important, typiquement 50 fois, il est possible de visualiser les détails mêmes de l'échantillon en train d'être analysé, comme les cellules uniques de dimension comprise entre 10 et 200 µm issues d'un prélèvement tissulaire, et de placer le faisceau laser d'analyse de l'échantillon de manière précise.

Ainsi, l'utilisation d'un système d'imagerie connu, intégrant le dispositif 10, demande à un opérateur de changer constamment de mode de grossissement pour trouver des zones d'intérêt en faible grossissement et ensuite placer le faisceau laser précisément avec l'image obtenue en fort grossissement. Ce va-et-vient entre les faible et fort grossissements demande à l'opérateur de faire correspondre mentalement les deux images. Ce travail est fastidieux et peut provoquer des biais d'observation, c'est-à-dire des erreurs d'observation.

Outre l'inconvénient d'obliger un opérateur à passer constamment du faible grossissement au fort grossissement, avec le risque inhérent d'erreurs d'observations, le dispositif de spectroscopie de Raman 10 illustré sur la figure 1 est encombrant et également pas simple d'utilisation du fait des réglages optiques préliminaires nécessaires pour mettre en œuvre l'analyse proprement dite, ces réglages consistant par exemple en des alignements, la recherche de la position focale optimale qui n'est pas la même entre un bon focus pour la visualisation en microscopie et un bon focus pour l'analyse Raman.

La demande de brevet WO2013/010023 décrit dans son mode de réalisation de la figure 3, un système d'imagerie d'échantillons biologiques par fluorescence comprenant un laser d'excitation agencée au-dessus d'un échantillon émet une lumière d'épifluorescence en direction de l'échantillon, une source lumineuse, agencée en dessous de l'échantillon, permet de l'éclairer sous incidence rasante afin de faciliter la détermination des zones d'intérêt à scanner par une caméra, de type à intégration de retard temporel (TDI acronyme anglais pour « *Time delay integration* »).

Si un utilisateur souhaite scanner plusieurs zones ou régions d'intérêt d'un même échantillon, le système divulgué nécessite un changement d'angle d'éclairage avec un déplacement du porte-échantillon relativement à la source d'éclairage de l'échantillon et au capteur de la caméra de visualisation, solidaire de ladite source. Or, ces ajustements génèrent un changement de l'image observée sur le capteur de la caméra de visualisation. Cela implique pour un utilisateur un temps de positionnement du spot de focalisation du laser long et assez fastidieux.

Il existe donc un besoin pour améliorer les dispositifs de spectroscopie, en particulier ceux mettant en œuvre une spectroscopie Raman, afin de pallier au moins certains des inconvénients susmentionnés.

Le but de l'invention est de répondre au moins en partie à ce besoin.

Exposé de l'invention

Pour ce faire, l'invention propose un dispositif de spectroscopie comprenant :

- un premier ensemble comprenant :

- un porte-échantillon, de préférence plan, pour recevoir l'échantillon à

analyser par spectroscopie, le porte-échantillon étant au moins partiellement translucide,

- une source lumineuse d'éclairage de l'échantillon, apte à éclairer l'échantillon, la source lumineuse d'éclairage de l'échantillon étant intégrée dans le porte-échantillon,

- un premier capteur de lumière pour recevoir la lumière émise par une source lumineuse d'éclairage de l'échantillon et traversant l'échantillon et le porte-échantillon, le premier capteur de lumière étant de préférence associé à un dispositif d'affichage de l'image captée par le premier capteur de lumière,

- un deuxième ensemble comprenant :

- une source lumineuse d'analyse de l'échantillon, et/ou un deuxième capteur de lumière adapté à capter la lumière transmise à travers ou réfléchi par l'échantillon à analyser,

- des moyens de collecte de la lumière diffusée par l'échantillon à analyser, excitée par la lumière émise par la source lumineuse d'analyse, associés à un spectromètre pour analyser la lumière diffusée par l'échantillon à analyser.

Les éléments du premier ensemble sont montés solidaires en translation selon au moins deux directions comprises dans un plan parallèle au porte-échantillon, de préférence encore selon trois directions dont deux sont comprises dans un plan parallèle au porte-échantillon et la troisième est perpendiculaire aux deux autres,

Les éléments du deuxième ensemble sont montés solidaires en translation.

Selon l'invention, le deuxième ensemble est indépendant en translation relative du premier ensemble selon au moins une direction, de préférence au moins deux directions comprises dans un plan parallèle au porte-échantillon, de préférence encore selon trois directions dont deux sont comprises dans un plan parallèle au porte-échantillon et la troisième est perpendiculaire aux deux autres.

Ainsi, l'invention consiste essentiellement à réaliser un seul bloc d'imagerie intégrant le porte-échantillon, la source d'éclairage de l'échantillon elle-même intégrée dans le porte-échantillon et le détecteur (capteur de lumière), et à le rendre mobile par rapport à l'ensemble de mesure intégrant les éléments d'excitation de l'échantillon, de préférence un laser, et les éléments de collecte de cette lumière.

Autrement dit, selon l'invention, on découple le déplacement de la partie d'excitation de l'échantillon par rapport à celui de la partie d'imagerie proprement dite dans un dispositif de spectroscopie.

Le fait d'intégrer la source d'éclairage de l'échantillon directement dans le porte-échantillon permet d'avoir toujours un éclairage constant au cours du temps et des déplacements du bloc d'imagerie, en choisissant un angle d'éclairage qui peut rester fixe pendant les déplacements.

Cela rend les déplacements du bloc d'imagerie indépendants des déplacements de la source d'excitation, telle qu'un laser, ce qui permet de choisir une configuration optique plus simple que dans les systèmes d'imagerie selon l'état de l'art, en particulier selon la demande WO2013/010023 précitée.

5 Du fait de l'intégration de l'éclairage de l'échantillon dans le porte-échantillon, le fonctionnement du capteur de lumière qui est également solidaire, n'est pas dépendant des déplacements du porte échantillon. Ainsi, si le porte échantillon se déplace, le capteur avec tout le bloc d'imagerie en fait de même. Et donc, le capteur de lumière va toujours donner la même image de l'échantillon. Cela est beaucoup moins contraignant que dans les systèmes d'imagerie
10 selon l'état de l'art, comme dans la demande WO2013/010023 précitée, dans lesquels le déplacement du porte échantillon implique nécessairement un changement de l'image sur le capteur.

Ainsi, grâce au bloc d'imagerie selon l'invention intégrant à la fois le porte-échantillon, la source d'éclairage de l'échantillon et le capteur de lumière, la source d'excitation
15 peut être fixe et focalisée sur une région d'intérêt de l'échantillon. Pour déplacer le spot de la source d'excitation, il suffit alors de déplacer le bloc d'imagerie par rapport à la position fixe de la source d'excitation, telle qu'un laser, ce qui peut se faire de manière quasi intuitive pour un utilisateur du dispositif selon l'invention.

Par conséquent, le dispositif de l'invention permet un positionnement du faisceau de
20 la source d'excitation sur des régions d'intérêt d'un échantillon plus simple, plus intuitif et plus rapide que dans les systèmes d'imagerie selon l'état de l'art, en particulier celui divulgué dans demande WO2013/010023 précitée,

Avantageusement et comme il apparaîtra plus clairement à la lecture de la description qui va suivre, le dispositif de spectroscopie selon l'invention facilite grandement l'utilisation car,
25 contrairement avec les dispositifs selon l'état de l'art, un opérateur peut visualiser un échantillon simultanément en faible grossissement et en fort grossissement.

Par ailleurs, le dispositif selon l'invention présente un encombrement plus faible que les dispositifs de spectroscopie de l'art antérieur, notamment dans la direction perpendiculaire au porte-échantillon.

30 En outre, un tel système est simple à réaliser et robuste.

De préférence, le dispositif selon l'invention présente une ou plusieurs des caractéristiques suivantes, prises seules ou en combinaison :

- la source lumineuse d'éclairage de l'échantillon est apte à éclairer l'échantillon avec une lumière d'incidence rasante, notamment avec un angle d'incidence compris entre 0° et 30°,

- la source lumineuse d'éclairage de l'échantillon comprend une ou plusieurs diodes situées, d'un même côté du plan du porte-échantillon, de préférence fixées sur le porte-échantillon, de préférence encore de part et d'autre d'une zone adaptée à recevoir l'échantillon à analyser.

5 Avantageusement, le premier ensemble comprend en outre un premier système de lentilles optiques disposé entre le porte-échantillon et le premier capteur de lumière. Ce premier système de lentilles présente de préférence un grossissement compris entre 1 et 20, en particulier égal à 10.

10 Selon un mode de réalisation avantageux, le deuxième capteur de lumière est associé à un deuxième système de lentilles optiques disposé entre le porte-échantillon et le deuxième capteur de lumière, le deuxième système de lentilles optiques présentant de préférence un grossissement différent, notamment supérieur, au grossissement du premier système de lentilles optiques. Ce deuxième système de lentilles présente de préférence un grossissement compris entre 20 et 100, en particulier égal à 50.

15 De préférence, la source lumineuse d'analyse de l'échantillon est un laser, associé de préférence à un collimateur du faisceau émis par le laser, disposé entre le laser et le porte-échantillon.

Le deuxième système de lentilles optiques est avantageusement disposé entre le laser de préférence entre le collimateur, et le porte-échantillon.

20 Selon une variante de réalisation avantageuse, les moyens de collecte comprennent au moins l'un parmi un séparateur du faisceau provenant de l'échantillon à analyser, un filtre coupe-bande et une lentille de collimation.

De préférence au moins l'un, de préférence encore les deux capteurs de lumière sont des capteurs CMOS, de préférence encore reliés à des écrans d'affichage.

25 Selon un autre aspect, l'invention se rapporte à un procédé de spectroscopie notamment procédé de spectroscopie Raman, mis en œuvre au moyen d'un dispositif de spectroscopie décrit précédemment, comprenant les étapes consistant à :

(i) exciter un échantillon à analyser au moyen d'un faisceau émis par la source lumineuse d'analyse,

30 (ii) collecter la lumière diffusée par l'échantillon à analyser suite à l'excitation par le faisceau émis par la source lumineuse d'analyse, et

(iii) analyser la lumière collectée à l'aide du spectroscope.

De préférence, le procédé comprend deux étapes préalables à l'étape (i) et consistant à :

a) déterminer une zone d'intérêt de l'échantillon à analyser éclairé à l'aide de la source lumineuse d'éclairage de l'échantillon, notamment à partir de l'image affichée par le dispositif d'affichage de l'image captée par le premier capteur de lumière, et

b) éteindre la source lumineuse d'éclairage de l'échantillon.

5 Les avantages du dispositif selon l'invention sont nombreux. En particulier, le dispositif selon le mode intégrant le deuxième capteur de lumière, le deuxième système de lentilles optiques à grossissement supérieur, au grossissement du premier système de lentilles optiques présente de nombreux avantages parmi lesquels :

10 - la possibilité de visualiser en simultanée le faisceau laser, l'échantillon et ce avec deux grossissement différents, ce qui n'a jamais été réalisé pour un dispositif de spectroscopie Raman, ni même pour le seul système d'imagerie;

15 - une visualisation en faible grossissement avec un éclairage, avantageusement en lumière rasante, de l'échantillon, qui est indépendante des déplacements selon les trois directions X, Y, Z. Cette configuration est donc robuste parce qu'elle ne nécessite pas de vérification d'alignement des optiques. Un tel système n'a jamais été réalisé dans un dispositif de spectroscopie Raman selon l'état de l'art, dans lequel au contraire le champ de visualisation, change avec le déplacement en X et Y et la focale change avec le déplacement en Z;

20 - une visualisation en fort grossissement, avantageusement en lumière rasante de l'échantillon, qui permet de suivre les déplacements selon deux directions X et Y sur l'échantillon tout en étant dépendante de la position selon la direction restante Z. Cette visualisation fort grossissement associée à une image grand champ évite un va et vient incessant entre les deux grossissements comme sur les dispositifs selon l'état de l'art;

25 - une analyse Raman possible en choisissant une région d'intérêt soit à partir de l'image faible grossissement, soit à partir de l'image fort grossissement. En choisissant l'image faible grossissement, il est possible de choisir des régions d'analyse sans être limité par le champ dimensionné par le choix du grossissement via l'objectif choisi et en ayant toujours la région d'intérêt comprise dans l'image. Cette possibilité n'est pas envisageable avec les dispositifs selon l'état de l'art dans lesquels l'analyse Raman se fait exclusivement à partir d'une image fort grossissement dimensionné par le choix de l'objectif utilisé in fine pour l'analyse Raman.

30 Une application importante du dispositif selon ce mode de réalisation de l'invention est l'analyse de tissus sur lame. En effet, une image en grand champ permet de localiser plus facilement et rapidement les zones tumorales ou non sur la lame, de définir des régions d'investigation, à l'aide de l'image en fort grossissement si nécessaire, de positionner précisément le faisceau laser d'excitation sur les zones d'intérêt afin de les analyser par une spectroscopie Raman.

35

Le dispositif selon l'invention est avantageusement compact, robuste, simple d'utilisation et automatisé de sorte qu'il peut être installé comme outil d'analyse dans les hôpitaux, les laboratoires d'analyse et les cabinets médicaux privés.

Description détaillée

5 L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description qui va suivre, à l'appui des dessins ci-annexés, sur lesquels :

- la figure 1 représente schématiquement en vue partiellement arrachée un dispositif de spectroscopie connu ;

- la figure 2 représente schématiquement un exemple de dispositif de spectroscopie
10 selon l'invention ;

- la figure 3 représente schématiquement un porte-échantillon avec un système pour l'éclairage rasant intégré, pouvant être mis en œuvre dans le dispositif de spectroscopie de la figure 2 ;

- les figures 4 à 7 illustrent des observations réalisées sur des prélèvements de tissus
15 issus de biopsie, au moyen du dispositif de spectroscopie de la figure 2 ;

- la figure 8 représente un exemple de spectre Raman acquis avec le dispositif de spectroscopie de la figure 2, à partir de l'observation de la figure 6 ;

- les figures 9A à 9D illustrent des réalisations d'une même zone d'intérêt d'un prélèvement de tissu, en image grand champ, sur lesquels le spot du laser en tant que source
20 lumineuse d'analyse est focalisé en différents points de la zone d'intérêt.

La figure 1 a déjà été décrite en préambule, elle n'est donc pas détaillée ci-après.

Sur la figure 2, il est représenté un dispositif de spectroscopie 100 selon l'invention. Ce dispositif de spectroscopie comporte essentiellement un système d'imagerie 102 et un spectromètre 104 relié optiquement au système d'imagerie 102, par exemple au moyen d'une fibre
25 optique 106. La fibre optique 106 est par exemple une fibre commercialisée sous la dénomination « Thorlabs M18L01, 105µm 0,22NA », tandis que le spectromètre est par exemple un spectromètre « Tornado Spectral System HyperFlux U1 ».

Tel qu'illustré, le système d'imagerie 102 comporte tout d'abord un porte-échantillon 108 destiné à recevoir un échantillon à analyser. Il est à noter ici que l'échantillon à analyser est
30 de préférence une biopsie, c'est-à-dire obtenu par prélèvement, le dispositif de spectroscopie de la figure 2 ne visant pas *a priori* l'analyse *in vivo* directement sur patient. Typiquement, l'échantillon peut avoir une épaisseur comprise entre 5 et 200µm, correspondant à l'épaisseur de la biopsie.

Le porte-échantillon 108 peut prendre la forme d'une lame, translucide ou, mieux,
35 transparente, au moins par endroits, notamment à des endroits où elle reçoit l'échantillon à

analyser. Notamment, la lame porte-échantillon 108 peut être translucide ou transparente dans une portion centrale, par exemple au niveau d'un disque central, le reste de la lame porte-échantillon 108 étant quant à lui opaque. La lame porte-échantillon 108 peut être munie de moyens pour fixer, au moins temporairement, l'échantillon à analyser en position sur la lame porte-échantillon 108.

- 5 Ces moyens de fixation peuvent par exemple prendre la forme de languettes métalliques, pliées pour contraindre l'échantillon à analyser contre la lame porte-échantillon 108. La lame porte-échantillon 108 est par exemple réalisée au moyen d'un substrat transparent ou semi-transparent présentant un taux de transmission d'au moins 30% dans la gamme spectrale 400-700 nm.

Un exemple de lame porte-échantillon 108 est représenté schématiquement sur la
10 figure 3. Cette lame porte échantillon 108 a sensiblement la forme d'une lame sensiblement plane 1081 présentant un sillon central 1082 formant un logement de réception de l'échantillon à tester. Le fond du sillon central 1082 définit un plan de la lame porte-échantillon 108. En son centre, le sillon central 1082 présente un trou traversant 1083. Ce trou traversant 1083 permet de fixer le porte-échantillon à un objectif par exemple un objectif de type grand angle comme celui
15 commercialisé sous la dénomination « NAVITAR NMV-6WA 6 mm F/1.4 1/2" M30.5 Wide Angle ». Autour de ce trou central 1083, la lame porte-échantillon 108 présente deux bourrelets 1084 présentant des ouvertures 1085 conformées pour recevoir des diodes électroluminescentes (LED), de telle sorte que ces diodes électroluminescentes éclairent l'échantillon avec une lumière d'incidence rasante.

20 Ces diodes électroluminescentes forment une première source lumineuse 110 du système d'imagerie 102. Cette première source lumineuse 110 permet d'éclairer l'échantillon à analyser avec une lumière d'incidence rasante. Par incidence rasante, on entend une lumière présentant un angle d'incidence, mesuré dans un plan perpendiculaire au plan de la lame porte-échantillon 108 – c'est-à-dire le plan de la figure 2 – sur l'échantillon à analyser ou la lame porte-
25 échantillon 108 compris entre 0° et 30°, de préférence compris entre 0° et 15°, de préférence encore compris entre 0° et 5°.

Ici, comme indiqué précédemment, cette première source lumineuse 110 est réalisée sous la forme de diodes électroluminescentes, orientée sensiblement parallèlement au plan du porte-échantillon 108. Les LED sont toutes disposées d'un même côté de la lame porte-
30 échantillon 108, c'est-à-dire dans un même demi-espace délimité par le plan de la lame porte-échantillon 108.

Cependant, les LED sont de préférence disposées de part et d'autre de la lame porte-échantillon 108, pour pouvoir éclairer l'échantillon avec des angles d'incidence différents, mesurés cette fois-ci dans un plan parallèle au plan de la lame porte-échantillon 108.

La première source lumineuse 110 est par exemple réalisée par 4 LED « Nichia NSPW510DS » disposées en parallèle qui éclairent à la droite de l'échantillon sur la figure 2, et de 4 LED « Nichia NSPW510DS » disposées en parallèle qui éclairent à la gauche de l'échantillon sur la figure 2.

5 Le système ou bloc d'imagerie 102 comporte encore un premier capteur de lumière 112 pour recevoir la lumière émise par l'échantillon à analyser suite à l'excitation par la première source lumineuse 110. Ici, ce premier capteur de lumière 112 est disposé du côté opposé de la lame porte-échantillon 108 par rapport à la première source lumineuse pour capter la lumière émise par la première source lumineuse 110 qui a traversé l'échantillon à analyser. En d'autres
10 termes, le premier capteur de lumière 112 et la source lumineuse 110 sont disposés dans deux demi-espaces distincts, délimités par le plan de la lame porte-échantillon 108.

Le premier capteur de lumière 112 peut être relié à un écran d'affichage (non représenté) pour afficher l'image captée. L'opérateur peut ainsi visualiser en continu l'image captée par ce premier capteur de lumière 112. Pour être facilement relié à un écran d'affichage, le
15 premier capteur de lumière 112 peut notamment être du type CMOS (de l'anglais «Complementary Metal Oxide Semiconductor »). Le premier capteur de lumière est par exemple un capteur CMOS « Mightex BCN-C050-U Color 5MP USB2.0 de 2592 X 1944 pixels » (2,2 µm X 2,2 µm pixel size).

Avantageusement, un premier système de lentilles optiques 114 est interposé entre la
20 lame porte-échantillon 108 et le premier capteur de lumière 112, notamment pour permettre de visualiser l'échantillon à tester avec un grandissement donné, éventuellement réglable.

Ici, on choisit un premier système de lentilles optiques 114 permettant au premier capteur de lumière 112 de capter une image étendue, notamment complète, de l'échantillon à analyser. En d'autres termes, on choisit le premier système de lentilles optiques 114 de telle sorte
25 qu'il présente un grossissement relativement faible, et donc un grand champ. Notamment, le grossissement du premier système de lentilles optiques 114 peut être compris entre 1 et 20, et plus particulièrement être égal à 2. Le premier système de lentilles optiques 114 est par exemple constitué par un objectif grand angle « NAVITAR NMV-6WA 6 mm F/1.4 1/2" M30.5 Wide Angle », placé en dessous de l'échantillon à analyser, comme représenté à la figure 2, et à une
30 distance de travail de 6 mm de cet échantillon à analyser.

Tel qu'illustré à la figure 2 et de manière particulièrement avantageuse la lame porte-échantillon 108, la première source lumineuse 110, le premier capteur de lumière 112 et le premier système de lentilles optiques 114 forment un premier ensemble 116 solidaire, notamment solidaire en translation.

Ici, ce premier ensemble 116 est solidaire en translation selon trois directions, deux directions étant parallèles au plan de la lame porte-échantillon 108, et la troisième étant perpendiculaire aux deux autres. Ceci est réalisé ici en fixant les éléments susmentionnés de l'ensemble 116 les uns par rapport aux autres, et en montant l'ensemble 116 sur une platine 118 de translation selon trois directions telles que décrites ci-avant.

Une telle platine peut par exemple être réalisée par la combinaison d'une platine motorisée « PI micos P-622.Z PIHera® Precision Z-Stage » pour assurer les déplacements selon l'axe perpendiculaire au plan de la lame porte-échantillon 108, fixée sur deux platines « PI micos Translation Stage VT-80, 50 mm travel range » pour réaliser les translations dans un plan parallèle au plan de la lame porte-échantillon. Une telle platine de translation 118 permet de déplacer tout l'ensemble 116 de manière solidaire, sans mouvement d'un élément de l'ensemble 116 par rapport à un autre. Ceci permet notamment au premier capteur de lumière 112 de capter une image identique de l'échantillon, quels que soient les déplacements de l'échantillon à analyser réalisés à l'aide de la platine de translation 118.

Le système d'imagerie 102 comprend par ailleurs une source lumineuse d'analyse de l'échantillon 120. Ici, cette source lumineuse d'analyse de l'échantillon prend la forme d'un laser 120, en particulier d'un laser « Spectra-Physics EXLSRONE-532FC-80, 80 mW monomode » longitudinal à 532 nm, modulable entre 0 et 80 mW monomode. Cette source lumineuse d'analyse de l'échantillon 120 est ici distincte de la première source lumineuse 110.

Ce laser 120 est ici associé à un premier dispositif de collimation 122 pour diriger le faisceau lumineux émis par le laser 120 vers une lame semi-réfléchissante 124. La lame semi-réfléchissante 124 permet de diriger le faisceau laser vers l'échantillon à analyser, via un deuxième système de lentilles optiques 126. Ici, le deuxième système de lentilles optiques 126 prend la forme d'un objectif, pouvant éventuellement être changé, d'un microscope 128 incluant la lame semi-réfléchissante 124.

À titre d'exemple, la lame semi-réfléchissante 124 peut être une lame « OPTOPRIM RazorEdge Dichroic beamsplitter LPD01-532RU-25x36x1.1 », le premier dispositif de collimation 122 un collimateur « Micro Laser Systems F-H10-VIS-APC », et le deuxième de système de lentilles optiques 126 un objectif « Olympus 50x LMPLFLN, NA 0,5 - WD 10,6 mm – FN 26.5 ».

La lumière émise par l'échantillon à analyser suite à l'excitation au moyen du faisceau émis par le laser 120 traverse la lame semi-réfléchissante 124, puis est collecté par des moyens de collecte 130.

Ces moyens de collecte 130 peuvent notamment comporter au moins l'un parmi une lame divisant le faisceau collecté, notamment la lame semi-réfléchissante 124, un filtre coupe-

bande, pour atténuer voire supprimer la longueur d'onde correspondant à celle du laser 120, et une lentille de collimation. Le filtre coupe-bande est par exemple un filtre « OPTOPRIM StopLine single-notch filter NF03-532E-25 », la lentille de collimation est connue sous la dénomination « Thorlabs AC254-030-ML ». Les moyens de collecte 130 sont reliés optiquement, par
5 l'intermédiaire d'une fibre de collection, au spectromètre 104, lequel peut ainsi mesurer l'intensité des différentes longueurs d'onde présentent dans la lumière émise par l'échantillon et en déduire le spectre d'émission.

Par ailleurs, le système d'imagerie 102 tel qu'illustré sur la figure 2, comporte un deuxième capteur de lumière 132 adapté à capter la lumière émise par la première source
10 lumineuse 110 et/ou le laser 120 et réfléchi par l'échantillon à analyser.

Pour pouvoir effectivement capter ces lumières, le deuxième capteur de lumière 132 est associé à la lame semi-réfléchissante 124 qui permet d'orienter une partie du faisceau lumineux provenant de l'échantillon à analyser vers le deuxième capteur de lumière 132. Ce deuxième capteur de lumière 132 peut également être du type CMOS et relié à un écran
15 d'affichage pour permettre à un opérateur de visualiser en temps réel l'image captée par ce deuxième capteur de lumière 132. Le deuxième capteur de lumière 132 est par exemple également un capteur CMOS « Mightex BCN-C050-U Color 5MP USB2.0 de 2592 X 1944 pixels » (2,2 μm X 2,2 μm pixel size).

De préférence, le deuxième capteur de lumière 132 est associé au système de lentilles optiques 126 ici formé par l'objectif du microscope 128, disposé optiquement entre l'échantillon à
20 analyser et le deuxième capteur de lumière 132. Ce deuxième système de lentilles optique 126 permet d'appliquer un grossissement fixe ou réglable à l'image effectivement captée par le deuxième capteur de lumière 132.

Ce grossissement est de préférence choisi différent du grossissement du premier
25 système de lentilles optiques 114, pour permettre à l'opérateur d'afficher deux images distinctes, notamment présentant un grossissement différent, de l'échantillon à analyser. Le deuxième système de lentilles optiques 126 présente par exemple un plus fort grossissement que le premier système de lentilles optiques 114 et donc, un champ réduit mais avec une meilleure résolution.

À titre d'exemple, le deuxième système de lentilles optiques 126 présente un
30 grossissement compris entre 5 et 100, par exemple égal à 50. Un tel grossissement permet de capter au moyen du deuxième capteur de lumière 132 une image agrandie, et donc plus résolue, de l'échantillon à analyser, notamment une image permettant de différencier les cellules de l'échantillon à analyser. Un système de collimation 134, notamment une lentille de collimation, est ici prévue entre le deuxième système à lentilles optiques 126 et le deuxième capteur de lumière
35 132 pour focaliser la lumière transmise par la lame semi-réfléchissante 124 vers le deuxième

capteur de lumière 132. Ce système de collimation 134 peut notamment prendre la forme d'une lentille de collimation « Thorlabs AC254-050-ML ».

Le deuxième ensemble 136 comportant notamment le laser 120, le dispositif de collimation 122, la lame semi-réfléchissante 124, le deuxième système de lentilles optiques 128, les moyens de collecte 130, le deuxième capteur de lumière 132 et le système de collimation 134 est solidaire, notamment solidaire en translation selon une direction comprise dans un plan parallèle au plan de la lame porte-échantillon 108, de préférence dans deux directions comprises dans ce plan, de préférence encore dans trois directions, dont deux sont comprises dans un plan parallèle au plan de la lame porte-échantillon 108 et une est perpendiculaire à ces deux directions. Ce deuxième ensemble 136 peut être déplacé, au moins selon une direction, de préférence selon deux, de préférence encore selon trois directions, par rapport à l'ensemble 116. On peut ainsi déplacer le faisceau émis par le laser 120 par rapport à l'échantillon à analyser et/ou améliorer la netteté de l'image captée par le deuxième capteur de lumière 132 et déplacer la position de la fibre de collecte, afin d'améliorer la qualité du signal Raman.

Ainsi, dans le dispositif de spectroscopie 100 de la figure 2, le premier capteur de lumière 112 capte un signal sensiblement constant provenant de l'échantillon à analyser, quels que soient les déplacements du deuxième ensemble 136 par rapport au premier ensemble 116, tandis que le deuxième capteur de lumière 132, lui, capte un signal qui varie en fonction de ces déplacements.

Le dispositif de spectroscopie 100 permet ainsi de fournir à l'utilisateur simultanément une vue grand champ (par exemple un champ de l'ordre de $1 \times 1 \text{ cm}^2$) de l'échantillon à analyser pour définir les zones d'intérêt (qui ont des dimensions de l'ordre de $100 \times 100 \text{ }\mu\text{m}^2$), et une vue en fort grossissement (par exemple un champ de l'ordre $100 \times 100 \text{ }\mu\text{m}^2$) pour placer le faisceau laser d'excitation très précisément sur les zones d'intérêt.

Le dispositif de spectroscopie 100 est en outre compact, simple d'utilisation, robuste et automatisable, permettant ainsi de le mettre en œuvre comme outil d'analyse dans les hôpitaux, les laboratoires d'analyse, et les cabinets médicaux privés comme outil de complément et d'aide rapide au diagnostic et/ou de détermination d'un traitement.

Le dispositif de spectroscopie 100 permet de mettre en œuvre le procédé de spectroscopie comprenant les étapes suivantes :

(i) exciter un échantillon à analyser au moyen d'un faisceau émis par la source lumineuse d'analyse,

(ii) collecter la lumière émise par l'échantillon à analyser suite à l'excitation par le faisceau émis par la source lumineuse, et

(iii) analyser de la lumière collectée à l'aide du spectroscope.

Dans le cas d'un procédé de spectroscopie Raman, la lumière collectée est filtrée pour supprimer la longueur d'onde de la source de lumière d'analyse. Cependant, d'autres procédés de spectroscopies peuvent également être mises en œuvre dans un tel dispositif. Par exemple, la lumière émise par l'échantillon à analyser peut être une lumière de fluorescence. Selon un autre exemple, la source de lumière d'analyse émet une longueur d'onde infrarouge.

Le procédé de spectroscopie peut en outre comprendre deux étapes préalables à l'étape (i) ci-dessus, consistant à :

a) déterminer une zone d'intérêt de l'échantillon à analyser éclairé à l'aide de la source lumineuse 110 d'éclairage de l'échantillon, notamment à partir de l'image affichée par le dispositif d'affichage de l'image captée par le premier capteur de lumière 112, et

b) éteindre la source lumineuse 110 d'éclairage de l'échantillon.

Ainsi, un opérateur peut visualiser une image grand champ de l'échantillon, invariable, éclairé en permanence par la source lumineuse 110 d'éclairage de l'échantillon et déterminer à l'aide de l'image affichée correspondante, les zones d'intérêt de l'échantillon à analyser. Le déplacement de l'échantillon à analyser (en fait du porte-échantillon) par rapport à la source lumineuse d'analyse 120 est également réalisé en conservant allumée la source lumineuse 110 d'éclairage de l'échantillon, l'image grand champ affichée restant identique. Il est ainsi plus facile pour l'opérateur de repérer les zones d'intérêt et de disposer correctement l'échantillon par rapport à la source lumineuse d'analyse 120. Cette source lumineuse d'analyse 120 peut également être allumée durant la recherche de zones d'intérêt de l'échantillon, afin d'assurer un positionnement correct de l'échantillon. Ensuite, une fois ce positionnement correct de l'échantillon à tester avec une zone d'intérêt excitée par la source lumineuse d'analyse 120, l'opérateur peut éteindre la source lumineuse 110 d'éclairage de l'échantillon et procéder à une analyse spectroscopique à l'aide de la source lumineuse d'analyse.

Une fois l'analyse terminée, la source lumineuse 110 peut être allumée à nouveau afin de permettre un nouveau cycle d'analyse.

Le dispositif de spectroscopie 100 a été mis en œuvre pour réaliser la collection en simultané de l'image grand champ et des images petit champ (respectivement avec un objectif de grossissement 20x et 50x) des figures 4 et 5.

Sur la figure 6, le laser est en fonctionnement, l'analyse par spectrométrie étant en cours de réalisation. Ces figures illustrent des analyses par spectrométrie Raman de biopsies de la prostate. Comme cela est visible sur ces figures, l'image grand champ, à gauche sur ces figures, est la même dans les trois cas, tandis que l'image à fort grossissement est différente. Ce dernier point s'explique par un déplacement de l'échantillon à analyser par rapport à l'objectif du

microscope utilisé, ce déplacement pouvant notamment permettre d'aligner précisément le faisceau Laser sur les cellules ou tissus à analyser.

La figure 7 illustre un exemple de visualisation d'un prélèvement de tissu chez une souris implantée avec carcinome HNSCC (« Head and Neck Squamous Cell Carcinoma »). Le spot laser L, généré par la source 120 est focalisé sur une région d'intérêt R de ce prélèvement positionné sur le porte-échantillon 108.

La figure 8 représente le spectre Raman de cette visualisation.

Il est à noter que l'objectif ici est la caractérisation des lames de biopsie par spectroscopie Raman. Cependant, grâce aux premier et/ou au deuxième capteurs de lumière, il est envisageable de coupler l'information du spectre avec une caractérisation morphologique parallèle, à partir de l'analyse soit de l'image grand champ, soit plutôt de l'image petit champ selon la résolution atteinte.

La présente invention ne se limite cependant pas au seul exemple décrit ci-avant en regard de la figure 2 et de nombreuses variantes peuvent être réalisées.

Par exemple, on peut imaginer de réaliser une analyse Raman avec uniquement le premier capteur de lumière, à l'exclusion du deuxième capteur de lumière. Cette solution peut rendre le dispositif de spectroscopie encore plus compact et simple à mettre en œuvre.

À la place du deuxième capteur de lumière, un deuxième système d'analyse peut être prévu. Ce deuxième système d'analyse est ainsi couplé avec le spectromètre Raman. Ce deuxième système d'analyse peut notamment être du type à imagerie de phase, à imagerie de fluorescence, notamment d'imagerie d'auto-fluorescence, à spectroscopie infrarouge, LIBS (de l'anglais « Laser Induced Breakdown Spectroscopy »), à spectroscopie UV.

En outre, le spectromètre ici mis en œuvre est adapté à réaliser une spectroscopie de type Raman. Il peut cependant être remplacé par tout dispositif permettant de réaliser une analyse par spectroscopie infrarouge ou par spectroscopie de fluorescence, notamment.

On a mis en évidence aux figures 9A à 9D, un avantage essentiel qu'apporte le bloc d'imagerie 116 selon l'invention qui intègre à la fois le porte-échantillon 108, la source d'éclairage sous incidence rasante 110, et le capteur 112, de type CMOS.

Ces différentes figures que pour une même image d'une région d'intérêt R d'un échantillon biologique, visualisée par un utilisateur, le spot L du laser d'excitation a été déplacé respectivement sensiblement en haut à droite de la région (figure 9A), sensiblement au centre de la région (figure 9B), en haut au milieu (figure 9C), et en bas à droite (figure 9D).

Ces déplacements du spot L du laser d'excitation 120 ont été obtenus en déplaçant uniquement le bloc d'imagerie 116 tout en laissant la source laser fixe. Ce déplacement est simple, rapide et quasi-intuitif pour l'utilisateur.

D'autres variantes et améliorations peuvent être apportées sans pour autant sortir du cadre de l'invention.

L'invention n'est pas limitée aux exemples qui viennent d'être décrits ; on peut notamment combiner entre elles des caractéristiques des exemples illustrés au sein de variantes
5 non illustrées.

REVENDICATIONS

1. Dispositif de spectroscopie (100) comprenant :

- un premier ensemble (116) comprenant :

5 • un porte-échantillon (108), de préférence plan, pour recevoir l'échantillon à analyser par spectroscopie, le porte-échantillon (108) étant au moins partiellement translucide,

 • une source lumineuse (110) d'éclairage de l'échantillon, apte à éclairer l'échantillon, la source lumineuse (110) d'éclairage de l'échantillon étant intégrée dans le porte-échantillon (108),

10 • un premier capteur de lumière (112) pour recevoir la lumière émise par une source lumineuse (110) d'éclairage de l'échantillon et traversant l'échantillon et le porte-échantillon (108), le premier capteur de lumière (112) étant de préférence associé à un dispositif d'affichage de l'image captée par le premier capteur de lumière (112),

- un deuxième ensemble (136) comprenant :

15 • une source lumineuse d'analyse de l'échantillon (120), et/ou un deuxième capteur de lumière (132) adapté à capter la lumière transmise à travers ou réfléchi par l'échantillon à analyser,

 • des moyens (130) de collecte de la lumière diffusée par l'échantillon à analyser, excité par la lumière émise par la source lumineuse d'analyse (120), associés à un spectromètre
20 (104) pour analyser la lumière diffusée par l'échantillon à analyser,

dispositif dans lequel les éléments du premier ensemble (116) sont montés solidaires en translation selon au moins deux directions comprises dans un plan parallèle au porte-échantillon (108), de préférence encore selon trois directions dont deux sont comprises dans un plan parallèle au porte-échantillon (108) et la troisième est perpendiculaire aux deux autres,

25 dans lequel les éléments du deuxième ensemble (136) sont montés solidaires en translation, et dans lequel le deuxième ensemble (136) est indépendant en translation relative du premier ensemble (116) selon au moins une direction, de préférence au moins deux directions comprises dans un plan parallèle au porte-échantillon (108), de préférence encore selon trois directions dont deux sont comprises dans un plan parallèle au porte-échantillon (108) et la
30 troisième est perpendiculaire aux deux autres.

2. Dispositif de spectroscopie selon la revendication 1, dans lequel la source lumineuse (110) d'éclairage de l'échantillon est apte à éclairer l'échantillon avec une lumière d'incidence rasante, notamment avec un angle d'incidence compris entre 0° et 30°.

3. Dispositif de spectroscopie selon l'une des revendications 1 ou 2, la source lumineuse (110) d'éclairage de l'échantillon comprenant une ou plusieurs diodes fixées d'un même côté du plan du porte-échantillon (108), , de préférence de part et d'autre d'une zone adaptée à recevoir l'échantillon à analyser.

4. Dispositif de spectroscopie selon l'une des revendications précédentes, le premier ensemble (116) comprenant en outre un premier système de lentilles optiques (114) disposé entre le porte-échantillon (108) et le premier capteur de lumière (112).

5. Dispositif de spectroscopie selon la revendication 4, dans lequel le premier système de lentilles (114) présente un grossissement compris entre 1 et 20, en particulier égal à 10.

6. Dispositif de spectroscopie selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le deuxième capteur de lumière (132) est associé à un deuxième système de lentilles optiques (126) disposé entre le porte-échantillon (108) et le deuxième capteur de lumière (132), le deuxième système de lentilles optiques (126) présentant de préférence un grossissement différent, notamment supérieur, au grossissement du premier système de lentilles optiques (114).

7. Dispositif de spectroscopie selon la revendication 6, dans lequel le deuxième système de lentilles (126) présente un grossissement compris entre 20 et 100, en particulier égal à 50.

8. Dispositif de spectroscopie l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la source lumineuse d'analyse de l'échantillon est un laser (120), associé de préférence à un collimateur (122) du faisceau émis par le laser (120), disposé entre le laser (120) et le porte-échantillon (108).

9. Dispositif de spectroscopie selon les revendications 6 et 8, dans lequel le deuxième système de lentilles optiques (126) est disposé entre le laser (120), de préférence entre le collimateur, et le porte-échantillon (108).

10. Dispositif de spectroscopie selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les moyens de collecte (130) comprennent au moins l'un parmi un

séparateur du faisceau provenant de l'échantillon à analyser, un filtre coupe-bande et une lentille de collimation.

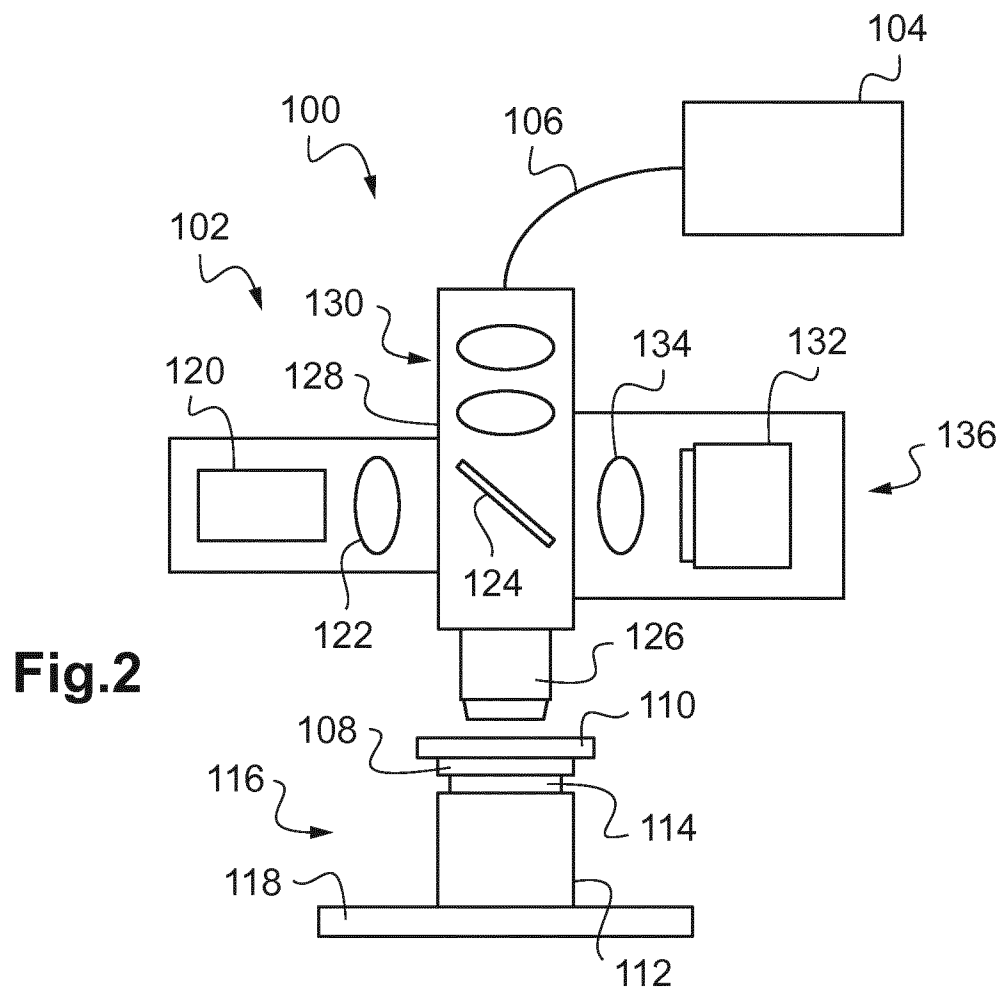
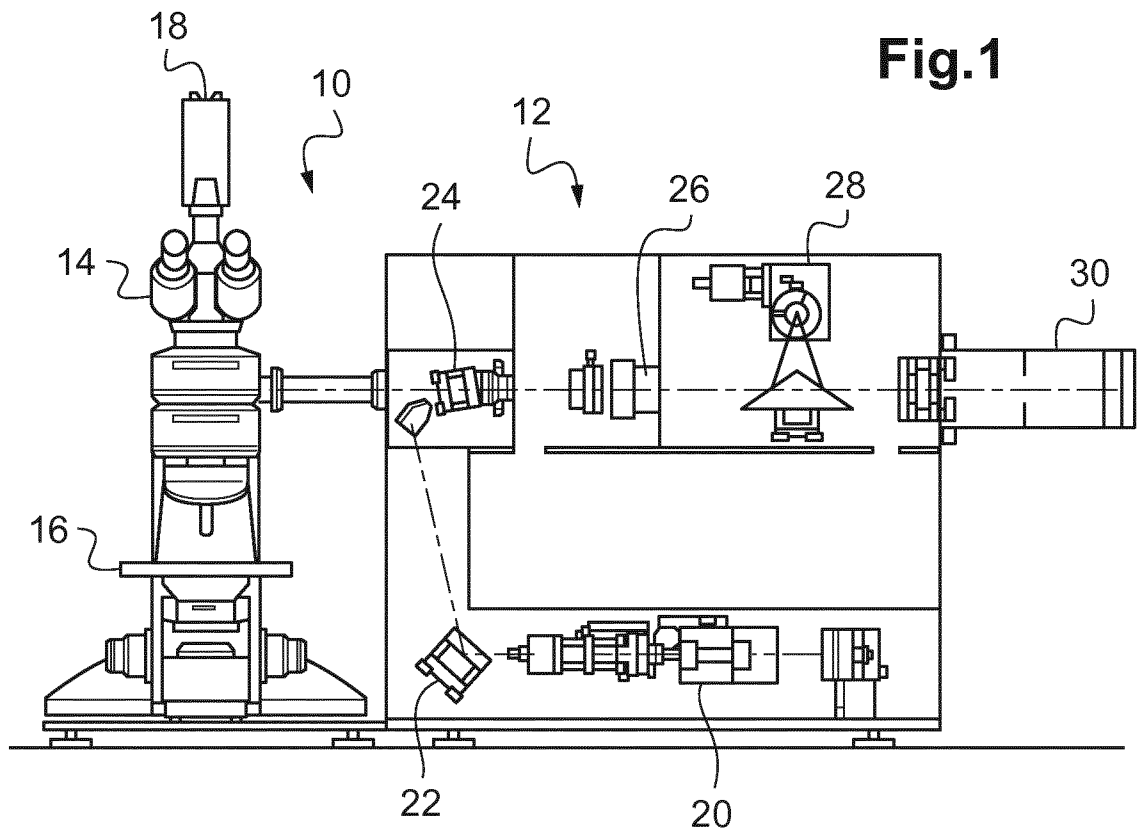
5 11. Dispositif de spectroscopie selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel au moins l'un, de préférence les deux capteurs de lumière (112 ; 132) sont des capteurs CMOS, de préférence encore reliés à des écrans d'affichage.

10 12. Procédé de spectroscopie, notamment procédé de spectroscopie Raman, mis en œuvre au moyen d'un dispositif de spectroscopie selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant les étapes consistant à :

- (i) exciter un échantillon à analyser au moyen d'un faisceau émis par la source lumineuse d'analyse (120),
- (ii) collecter la lumière diffusée par l'échantillon à analyser suite à l'excitation par le faisceau émis par la source lumineuse d'analyse (120), et
- 15 (iii) analyser la lumière collectée à l'aide du spectroscope (104).

13. Procédé de spectroscopie selon la revendication 12, comprenant deux étapes préalables à l'étape (i) et consistant à :

- a) déterminer une zone d'intérêt de l'échantillon à analyser éclairé à l'aide de la
- 20 source lumineuse (110) d'éclairage de l'échantillon, notamment à partir de l'image affichée par le dispositif d'affichage de l'image captée par le premier capteur de lumière (112), et
- b) éteindre la source lumineuse (110) d'éclairage de l'échantillon.



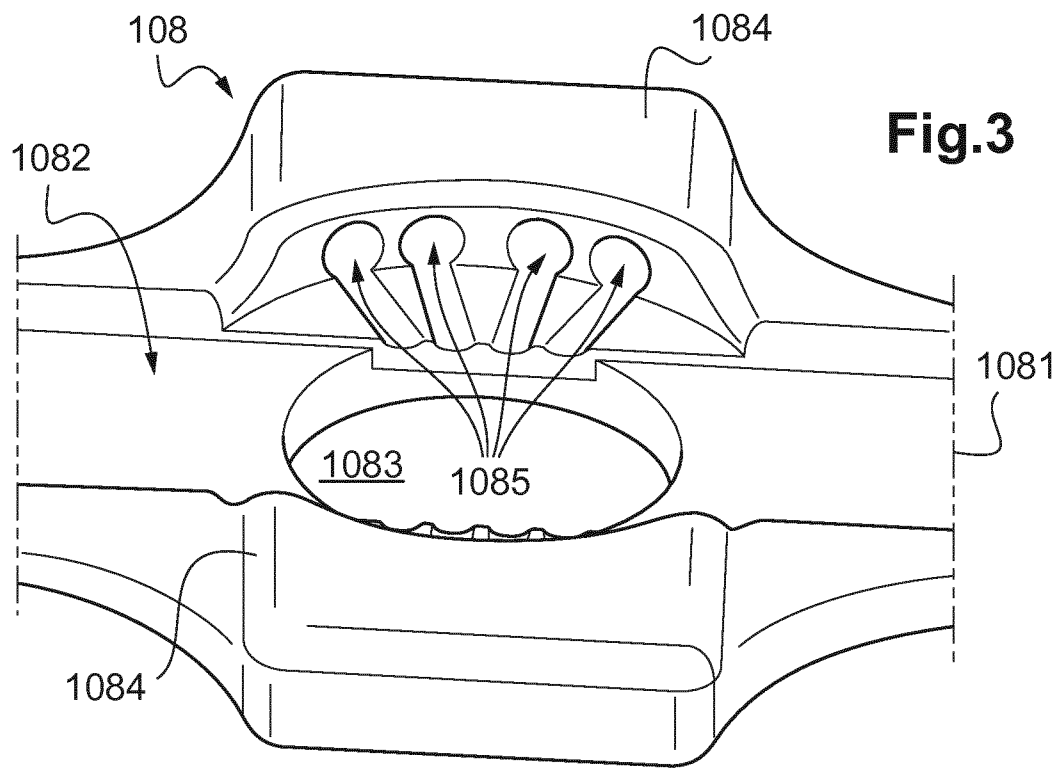


Fig. 4

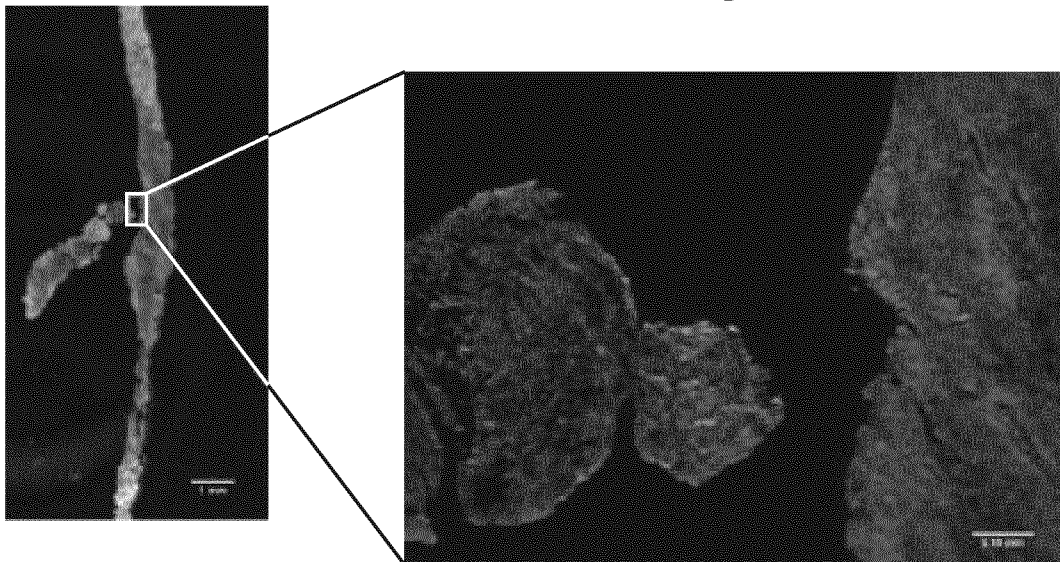


Fig.5

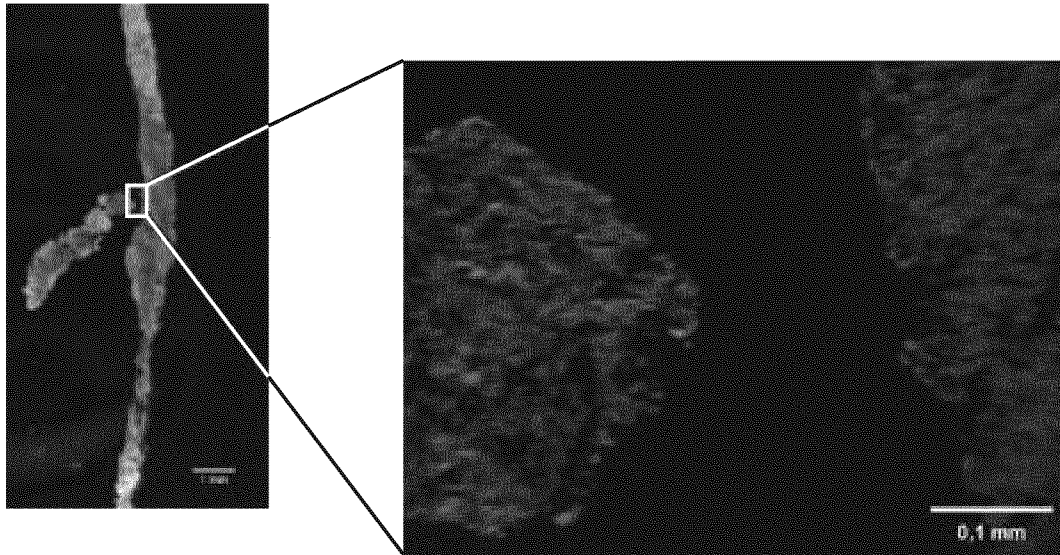
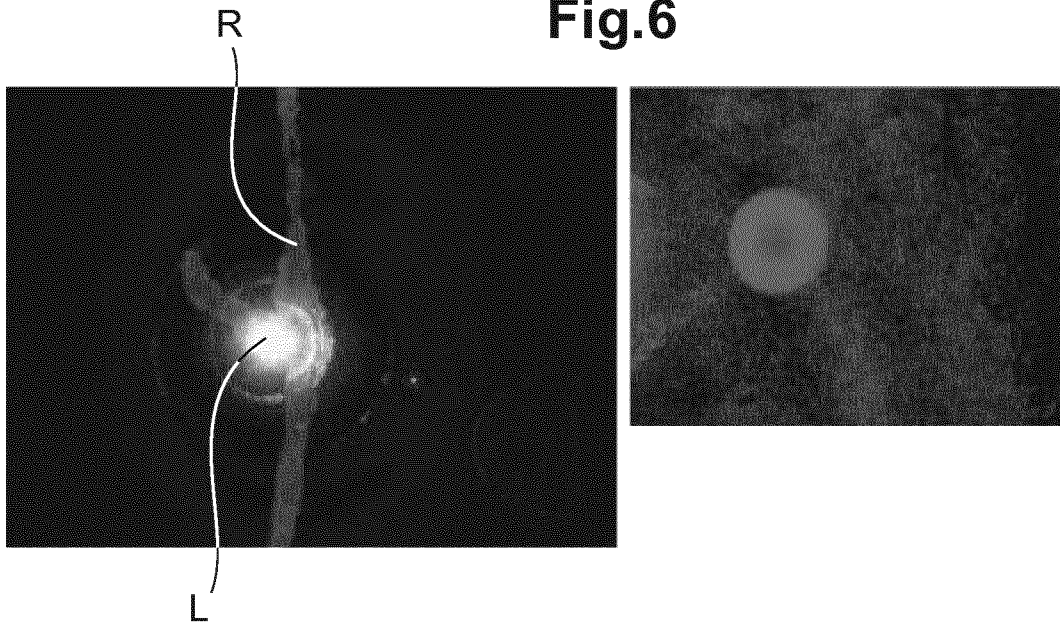


Fig.6



4/5

Fig.7

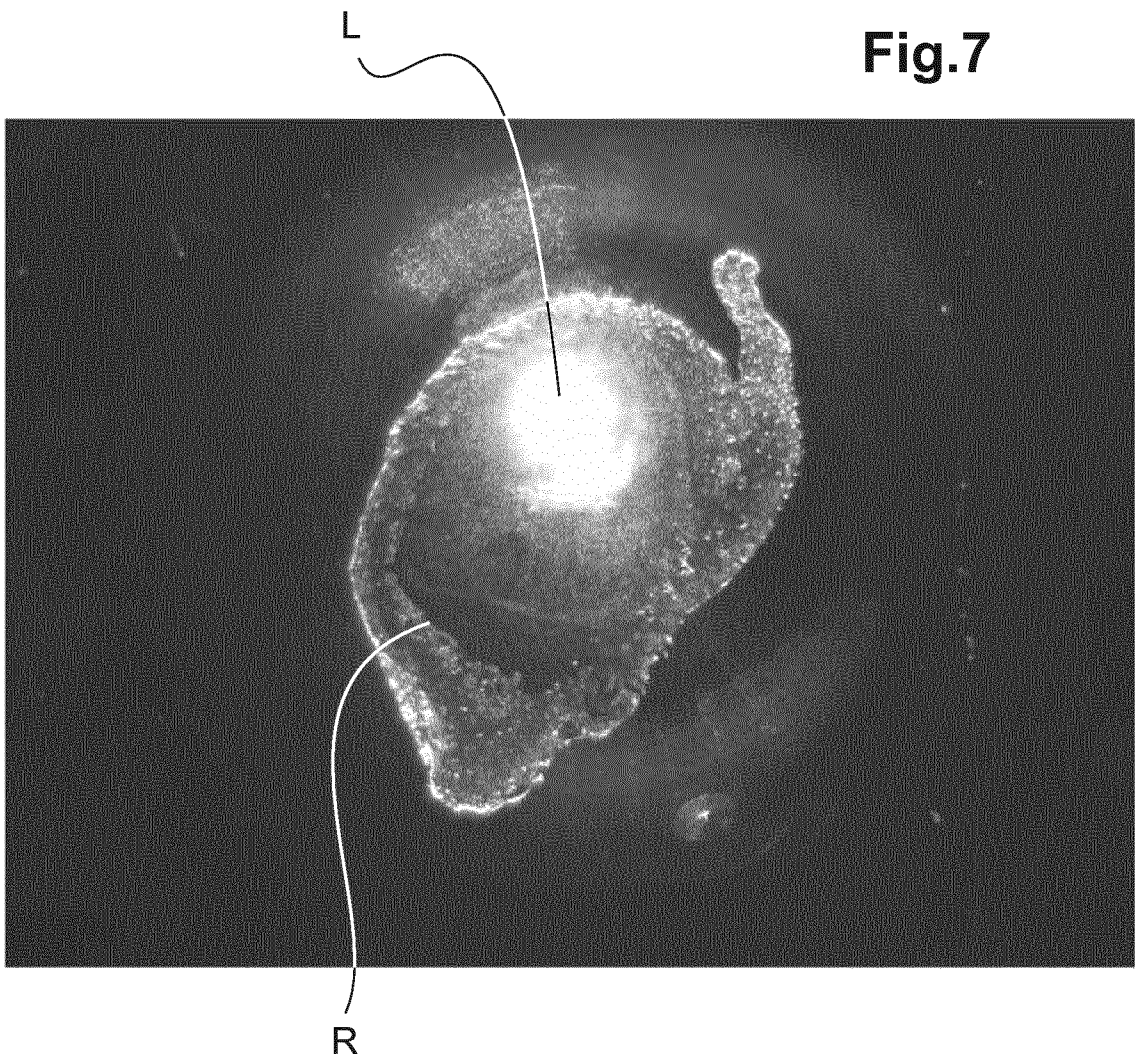


Fig.8

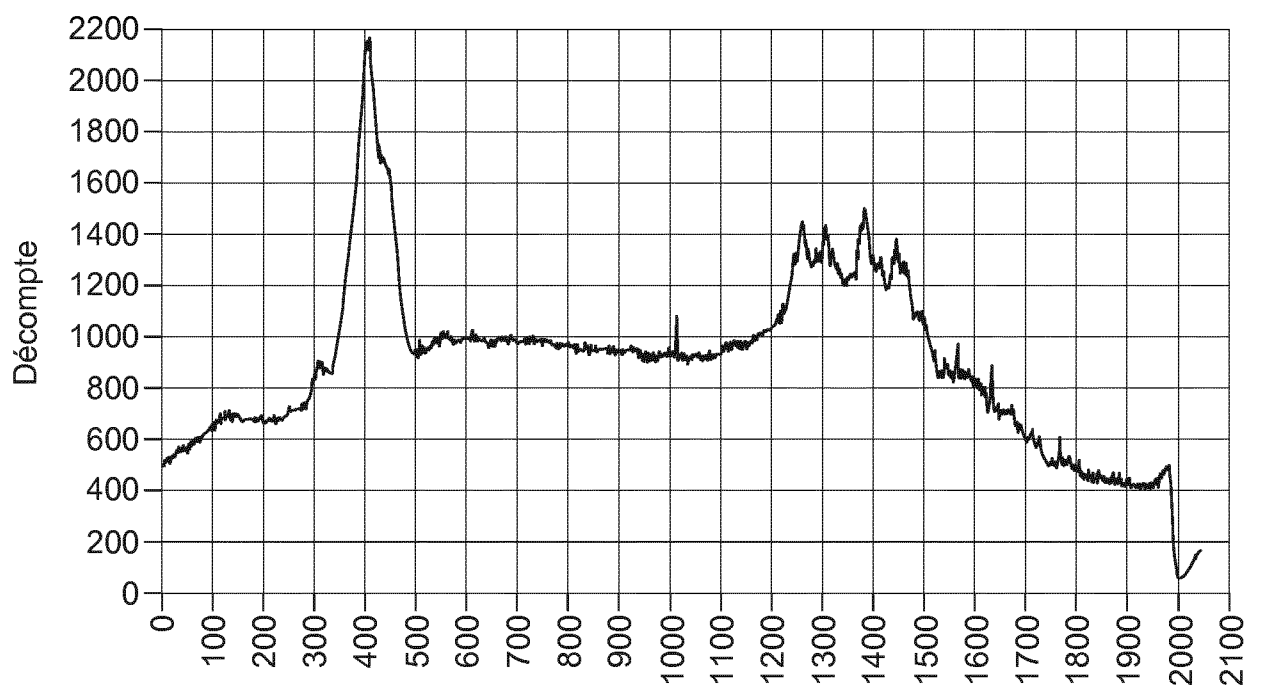


Fig.9A

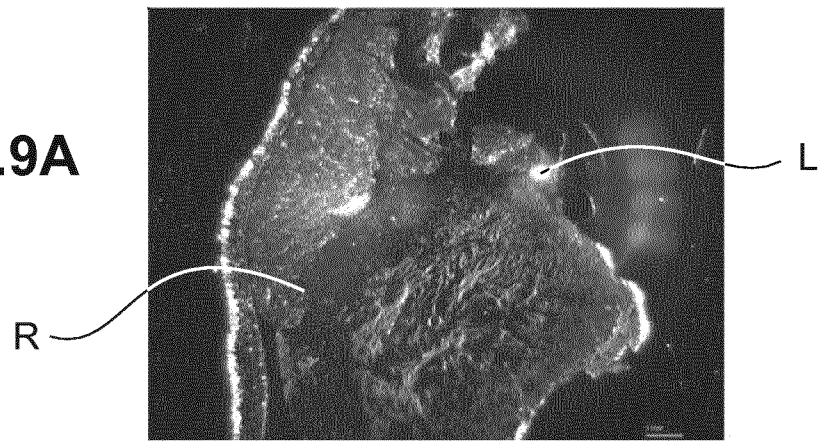


Fig.9B

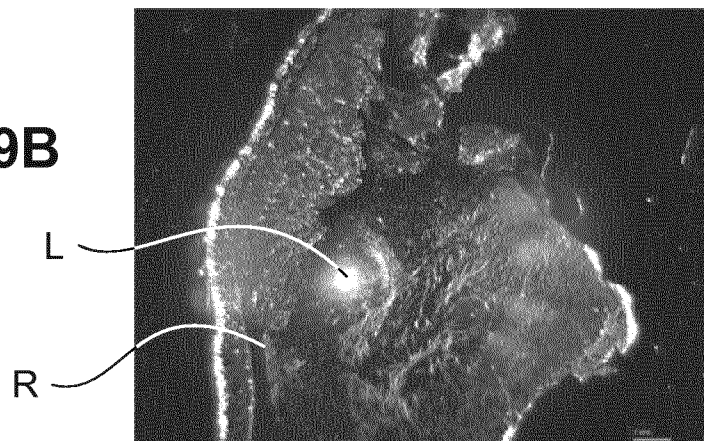


Fig.9C

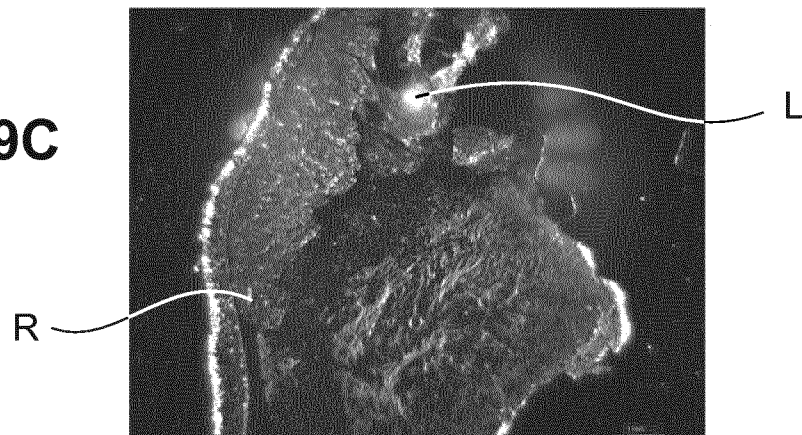
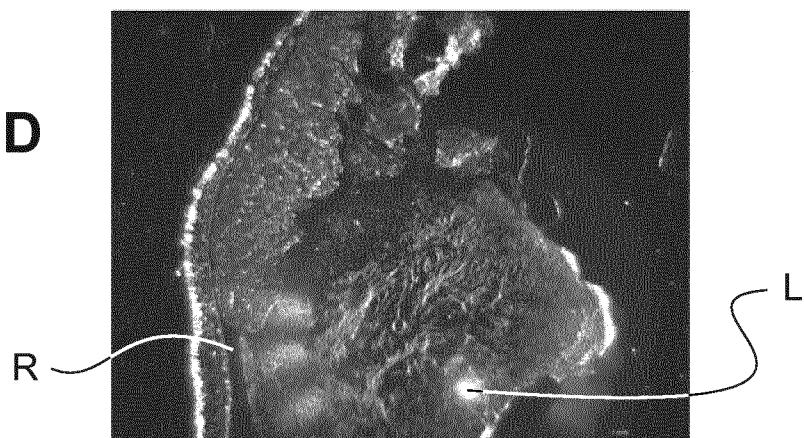


Fig.9D



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/066301

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01J3/02 G01J3/44 G02B21/08 G01N21/65
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G02B G01J G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/118263 A1 (COMMISSARIAT L ÉNERGIE ATOMIQUE ET AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES [FR]) 7 August 2014 (2014-08-07) page 4, line 24 - page 8, line 8 page 16, line 22 - page 17, line 31; figures 1,24	1-13
Y	JP 2005 234262 A (OLYMPUS CORP) 2 September 2005 (2005-09-02) abstract; figures 1-10	1-13
Y	JP 2004 094176 A (ISHIZUKI HIDEAKI; UNIV WASEDA) 25 March 2004 (2004-03-25) abstract; figures 1-3	1,2,4-13
	----- -/-	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 September 2016

Date of mailing of the international search report

07/10/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Frisch, Anna Maria

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/066301

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 102 07 029 A1 (KURZ FABIAN [DE]; KOENIG MICHAEL [DE]; HUESMANN MARTIN [DE]; BRACKER P) 18 September 2003 (2003-09-18) paragraph [0009]; figure 2 -----	1-13
Y	CA 2 441 726 A1 (RICHARDSON TECHNOLOGIES INC [CA]) 24 August 2000 (2000-08-24) page 10, line 12 - page 13, line 2; figures 1-8 -----	1-13
Y	DE 10 2004 017694 B3 (SCHOTT AG [DE]) 15 September 2005 (2005-09-15) paragraph [0047] - paragraph [0050]; figures 1-8 -----	1-13
Y	WO 2013/010023 A2 (APERIO TECHNOLOGIES INC [US]; CRANDALL GREGORY [US]; OLSON ALLEN [US]) 17 January 2013 (2013-01-17) cited in the application paragraph [0093] - paragraph [0120]; figure 3 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/066301

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014118263 A1	07-08-2014	CA 2898641 A1	07-08-2014
		EP 2951558 A1	09-12-2015
		FR 3001544 A1	01-08-2014
		JP 2016507053 A	07-03-2016
		US 2016011117 A1	14-01-2016
		WO 2014118263 A1	07-08-2014
JP 2005234262 A	02-09-2005	NONE	
JP 2004094176 A	25-03-2004	NONE	
DE 10207029 A1	18-09-2003	NONE	
CA 2441726 A1	24-08-2000	CA 2262823 A1	24-08-2000
		CA 2441726 A1	24-08-2000
DE 102004017694 B3	15-09-2005	DE 102004017694 B3	15-09-2005
		US 2005225851 A1	13-10-2005
WO 2013010023 A2	17-01-2013	EP 2737453 A2	04-06-2014
		JP 5989109 B2	07-09-2016
		JP 2014524051 A	18-09-2014
		US 2014226866 A1	14-08-2014
		US 2015204784 A1	23-07-2015
		WO 2013010023 A2	17-01-2013

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2016/066301

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. G01J3/02 G01J3/44 G02B21/08 G01N21/65 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G02B G01J G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 2014/118263 A1 (COMMISSARIAT L ÉNERGIE ATOMIQUE ET AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES [FR]) 7 août 2014 (2014-08-07) page 4, ligne 24 - page 8, ligne 8 page 16, ligne 22 - page 17, ligne 31; figures 1,24	1-13
Y	JP 2005 234262 A (OLYMPUS CORP) 2 septembre 2005 (2005-09-02) abrégé; figures 1-10	1-13
Y	JP 2004 094176 A (ISHIZUKI HIDEAKI; UNIV WASEDA) 25 mars 2004 (2004-03-25) abrégé; figures 1-3	1,2,4-13
	-/-	
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 28 septembre 2016		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 07/10/2016
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Frisch, Anna Maria

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	DE 102 07 029 A1 (KURZ FABIAN [DE]; KOENIG MICHAEL [DE]; HUESMANN MARTIN [DE]; BRACKER P) 18 septembre 2003 (2003-09-18) alinéa [0009]; figure 2 -----	1-13
Y	CA 2 441 726 A1 (RICHARDSON TECHNOLOGIES INC [CA]) 24 août 2000 (2000-08-24) page 10, ligne 12 - page 13, ligne 2; figures 1-8 -----	1-13
Y	DE 10 2004 017694 B3 (SCHOTT AG [DE]) 15 septembre 2005 (2005-09-15) alinéa [0047] - alinéa [0050]; figures 1-8 -----	1-13
Y	WO 2013/010023 A2 (APERIO TECHNOLOGIES INC [US]; CRANDALL GREGORY [US]; OLSON ALLEN [US]) 17 janvier 2013 (2013-01-17) cité dans la demande alinéa [0093] - alinéa [0120]; figure 3 -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2016/066301

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2014118263 A1	07-08-2014	CA 2898641 A1	07-08-2014
		EP 2951558 A1	09-12-2015
		FR 3001544 A1	01-08-2014
		JP 2016507053 A	07-03-2016
		US 2016011117 A1	14-01-2016
		WO 2014118263 A1	07-08-2014
JP 2005234262 A	02-09-2005	AUCUN	
JP 2004094176 A	25-03-2004	AUCUN	
DE 10207029 A1	18-09-2003	AUCUN	
CA 2441726 A1	24-08-2000	CA 2262823 A1	24-08-2000
		CA 2441726 A1	24-08-2000
DE 102004017694 B3	15-09-2005	DE 102004017694 B3	15-09-2005
		US 2005225851 A1	13-10-2005
WO 2013010023 A2	17-01-2013	EP 2737453 A2	04-06-2014
		JP 5989109 B2	07-09-2016
		JP 2014524051 A	18-09-2014
		US 2014226866 A1	14-08-2014
		US 2015204784 A1	23-07-2015
		WO 2013010023 A2	17-01-2013