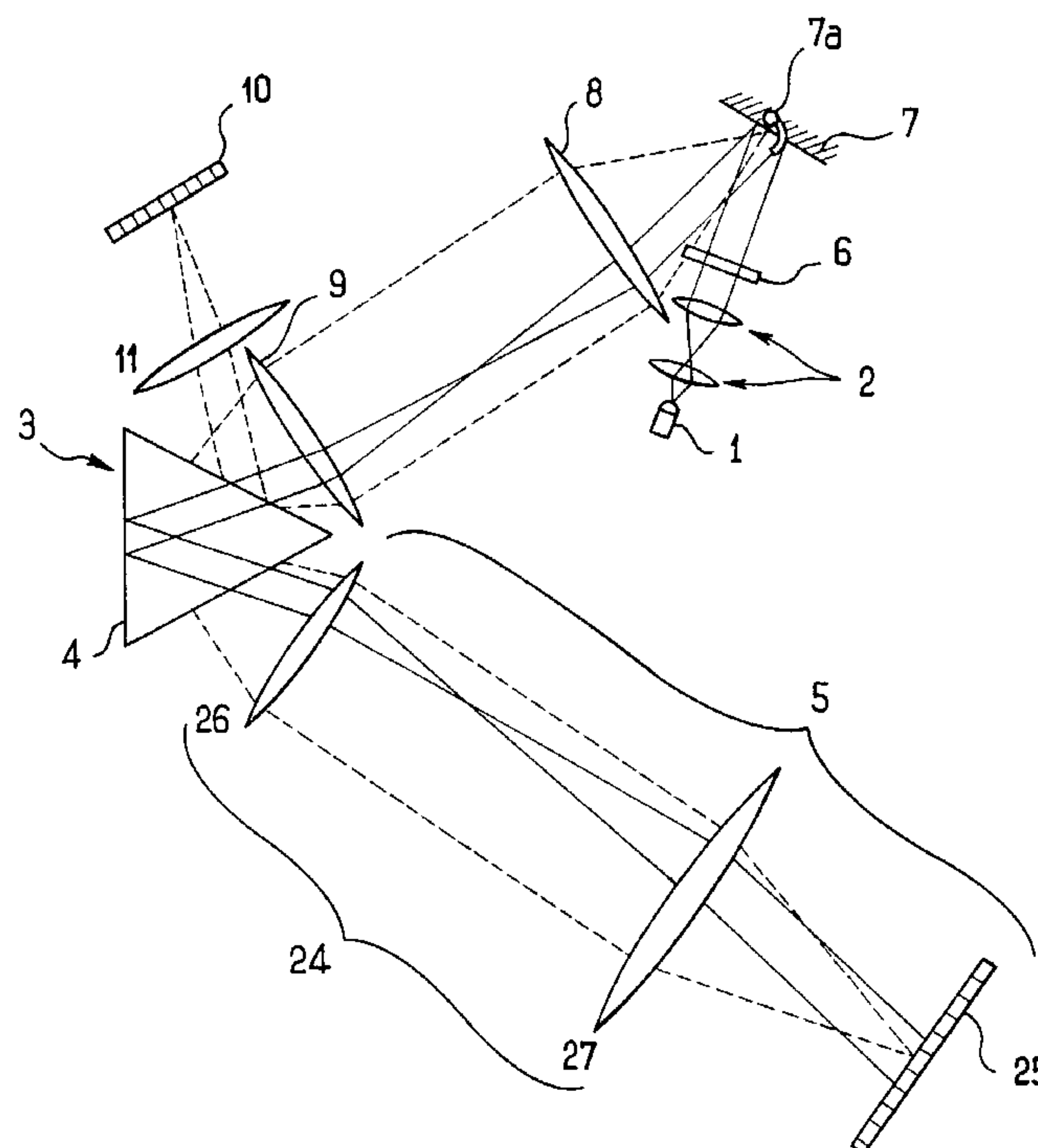




(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2001/12/13
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2002/06/20
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2003/06/11
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2001/003991
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2002/048689
(30) Priorités/Priorities: 2000/12/13 (00/16248) FR;
2000/12/13 (00/16247) FR

(51) Cl.Int.⁷/Int.Cl.⁷ G01N 21/55
(71) Demandeur/Applicant:
INSTITUT D'OPTIQUE THEORIQUE ET APPLIQUEE,
FR
(72) Inventeurs/Inventors:
GUEDON, PHILIPPE, FR;
LEVY, YVES, FR
(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : PROCEDE DE CARACTERISATION D'UNE SURFACE, ET DISPOSITIF POUR SA MISE EN OEUVRE
(54) Title: METHOD FOR CHARACTERISING A SURFACE, AND DEVICE THEREFOR



(57) **Abrégé/Abstract:**

Procédé de caractérisation de la surface d'une couche sensible déposée sur la base d'un prisme optique, ladite surface comportant des zones actives dont l'épaisseur optique est susceptible de varier avec le temps, ledit procédé utilisant une technique fondée sur l'analyse de la variation de la réflectivité de l'interface prisme - couche sensible, dans lequel on fait entrer dans le prisme un faisceau lumineux collimaté avec un angle d'incidence permettant la réflexion totale sur la base du prisme, ledit faisceau éclairant une partie fixe de l'interface correspondant à une partie à caractériser, on effectue un balayage en angle de façon à repérer une incidence pour laquelle la réflectivité des zones actives est minimum, on détermine un angle d'incidence optimal pour la sensibilité de détection des zones actives, on règle l'incidence à la valeur optimale, et on mesure la réflectivité à l'aide d'un système d'imagerie; et dispositif pour mettre en oeuvre ce procédé.



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

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international**



(43) Date de la publication internationale
20 juin 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/48689 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

00/16248

13 décembre 2000 (13.12.2000)

FR

G01N 21/55

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/03991

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : INSTITUT D'OPTIQUE THEORIQUE ET APPLIQUEE
[FR/FR]; Centre Universitaire d'Orsay, Bâtiment 503,
F-91403 Orsay Cedex (FR).

(22) Date de dépôt international :

13 décembre 2001 (13.12.2001)

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GUEDON, Philippe [FR/FR]; 11, avenue Paul Doumer, F-94110 Arcueil (FR). **LEVY, Yves** [FR/FR]; 35, rue Savier, F-92240 Chatillon (FR).

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/16247

13 décembre 2000 (13.12.2000)

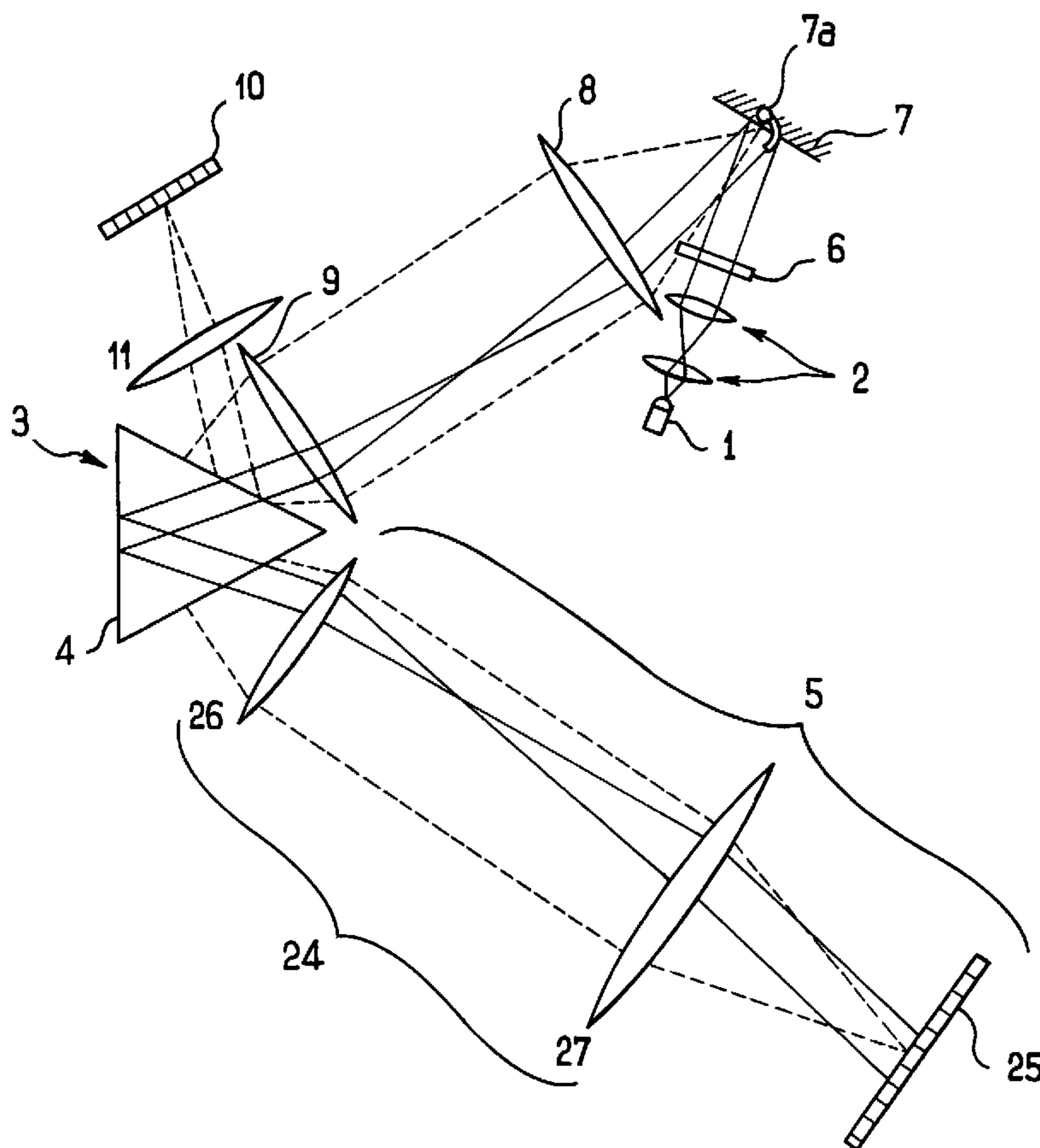
FR

(74) Mandataire : TONNELIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 3, rue de Penthièvre, F-75008 Paris (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR CHARACTERISING A SURFACE, AND DEVICE THEREFOR

(54) Titre : PROCÉDE DE CARACTERISATION D'UNE SURFACE, ET DISPOSITIF POUR SA MISE EN OEUVRE



(57) Abstract: The invention concerns a method for characterising the surface of a sensitive layer deposited on the base of an optical prism, said surface comprising active zones whereof the optical thickness is capable of varying with time, said method using a technique based on analysis of the reflective variation of the prism-sensitive layer interface. The method consists in causing: a collimated light beam with an angle of incidence enabling total reflection on the prism base to penetrate into the prism, said beam illuminating a fixed part of the interface corresponding to the part to be characterised; scanning at an angle so as to locate an incidence whereon the reflectivity of the active zones is minimal; determining an angle of incidence optimal for sensitivity of detection of the active zones; adjusting the incidence to the optimal value; and measuring the reflectivity with an imaging system. The invention also concerns a device for implementing said method.

[Suite sur la page suivante]

WO 02/48689 A1



(81) **États désignés** (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(84) **États désignés** (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,

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

(57) **Abrégé :** Procédé de caractérisation de la surface d'une couche sensible déposée sur la base d'un prisme optique, ladite surface comportant des zones actives dont l'épaisseur optique est susceptible de varier avec le temps, ledit procédé utilisant une technique fondée sur l'analyse de la variation de la réflectivité de l'interface prisme - couche sensible, dans lequel on fait entrer dans le prisme un faisceau lumineux collimaté avec un angle d'incidence permettant la réflexion totale sur la base du prisme, ledit faisceau éclairant une partie fixe de l'interface correspondant à une partie à caractériser, on effectue un balayage en angle de façon à repérer une incidence pour laquelle la réflectivité des zones actives est minimum, on détermine un angle d'incidence optimal pour la sensibilité de détection des zones actives, on règle l'incidence à la valeur optimale, et on mesure la réflectivité à l'aide d'un système d'imagerie; et dispositif pour mettre en oeuvre ce procédé.

Procédé de caractérisation d'une surface, et dispositif pour sa mise en œuvre

La présente invention se rapporte à un procédé de caractérisation d'une surface, et à un dispositif permettant de mettre en œuvre ce procédé. Ce procédé permet notamment une mesure qualitative et/ou quantitative d'interactions qui peuvent être
5 physiques, chimiques, biochimiques ou biologiques.

La plupart des procédés existants, dans ce domaine, utilisent des marqueurs fluorescents pour révéler les interactions moléculaires et nécessitent de travailler dans des conditions spécifiques. Ces conditions spécifiques ne permettent pas d'analyser plusieurs types d'interaction simultanément. Au contraire, le procédé de l'invention
10 permet notamment de suivre en temps réel, et sans marqueurs, jusqu'à plusieurs centaines d'interactions moléculaires, à la fois qualitativement et quantitativement.

Le procédé de l'invention permet la caractérisation de la surface d'une couche sensible, déposée sur la base d'un prisme optique, selon une technique fondée sur l'analyse de la variation de la réflectivité de l'interface prisme - couche sensible.
15 Cette réflectivité est susceptible de varier avec l'angle d'incidence d'un faisceau lumineux se dirigeant dans le prisme vers une partie de l'interface correspondant à une partie à caractériser de ladite surface. Cette réflectivité varie également en fonction de l'épaisseur optique de la couche sensible, de sorte que le procédé de l'invention permet notamment de caractériser l'évolution de zones de la couche sensible dont l'épaisseur
20 optique est susceptible de varier avec le temps. La partie de l'interface « correspondant » à la partie à caractériser est bien entendu la partie qui est en regard de la partie de la surface à caractériser.

Le procédé de l'invention peut être utilisé notamment soit dans les techniques fondées sur la résonance des plasmons de surface, soit dans les techniques
25 fondées sur l'interférométrie et utilisant le couplage entre un prisme et un guide d'ondes.

L'invention a notamment pour objet un procédé de caractérisation de la surface d'une couche sensible, ladite surface comportant des zones actives dont l'épaisseur optique est susceptible de varier avec le temps, ladite couche sensible étant
30 déposée sur la base d'un prisme optique, ledit procédé utilisant une technique fondée sur l'analyse de la variation de la réflectivité de l'interface prisme - couche sensible, dans lequel :

a) on fait entrer dans le prisme, par une face d'entrée, un faisceau lumineux

collimaté avec un angle d'incidence permettant la réflexion totale sur la base du prisme, ledit faisceau éclairant une partie fixe de l'interface correspondant à une partie à caractériser, appelée partie utile, de ladite surface, et le faisceau réfléchi ressortant en faisceau émergent par la surface de sortie du prisme,

5 b) on effectue un balayage en angle de la partie utile, en faisant varier l'angle d'incidence dudit faisceau, de façon à repérer une incidence pour laquelle la réflectivité d'au moins une partie, ou de la totalité, des zones actives, est minimum,

 c) on détermine un angle d'incidence optimal, pour lequel la sensibilité de détection des zones actives est maximale,

10 d) on règle l'incidence à la valeur optimale déterminée à l'étape précédente,

 et on mesure la réflectivité à l'aide d'un système d'imagerie et de détection ayant une surface sensible apte à recevoir la totalité du faisceau émergent provenant de la partie utile.

15 Un faisceau collimaté est un faisceau dont tous les rayons sont parallèles.

 Le prisme est utilisé, dans le procédé et le dispositif de l'invention, comme un prisme de couplage, qui utilise le phénomène de réflexion totale sur une interface.

 La surface à caractériser de la couche sensible est celle de la face externe de la couche sensible, en contact avec le milieu extérieur.

20 En pratique, la couche mince sensible peut être déposée soit sur la base du prisme, soit sur une lame transparente plane à faces parallèles, ayant le même indice ou un indice voisin de celui du prisme, et fixée, ou apte à être fixée, sur la base du prisme, avec la couche sensible déposée sur la face externe, qui n'est pas en contact avec la base du prisme. Cette face externe peut être considérée comme la véritable base du prisme
25 dans un tel cas, lorsqu'elle est fixée au prisme.

 La couche sensible peut être une couche mince métallique, et dans ce cas le procédé de l'invention utilise le phénomène de résonance des plasmons de surface. Parmi les métaux utilisés, on peut citer notamment l'or et l'argent. On peut utiliser une couche mince métallique intermédiaire, par exemple de chrome, pour améliorer
30 l'accrochage de la couche d'or sur le verre du prisme. On peut aussi déposer sur le prisme une couche d'argent elle-même recouverte d'une couche d'or, ce qui permet de protéger l'argent contre l'oxydation.

 La couche sensible métallique peut être déposée sur la base du prisme, ou

sur une couche mince, déposée sur la base du prisme, d'un diélectrique de faible indice (indice égal ou voisin de celui du prisme).

La couche sensible peut aussi être une couche mince, transparente, d'un diélectrique d'indice élevé capable de servir de guide d'onde. Dans ce cas, on dépose sur la base du prisme deux couches minces de diélectriques, d'abord une couche mince (par exemple de silice) servant de milieu espaceur, d'indice intermédiaire entre celui du prisme et celui de la couche guidante, puis la couche guidante, d'indice élevé. La couche guidante peut être réalisée par exemple avec des oxydes de titane ou d'osmium, stoechiométriques ou non stoechiométriques. La couche guidante peut elle-même être recouverte d'une couche mince métallique.

Lorsque la couche sensible est une couche de diélectrique servant de guide d'onde, le procédé de l'invention permet notamment d'utiliser le guide d'onde comme un système à miroir résonant qui nécessite une source lumineuse cohérente. Le principe et les applications du miroir résonant sont connus ; voir par exemple R. Cush *et al.*, Biosensors & Bioelectronics **8**, 347-353 (1993) ; P. E. Buckle *et al.*, Biosensors & Bioelectronics **8**, 355-363 (1993) ; S. F Bier, Sensors & Actuators B, **29**, 37-50 (1995) ; C. Stamm *et al.*, Sensors & Actuators B, **31**, 203-207 (1996) ; A. Bernard *et al.*, Eur. J. Biochem., **230**, 416-423 (1995). Le contenu de ces documents de la littérature, ainsi que des documents mentionnés ci-dessous, est incorporé par référence à la présente description.

Les couches minces utilisées dans la mise en œuvre du procédé de l'invention peuvent être déposées selon les méthodes connues, par exemple par évaporation sous vide, pulvérisation cathodique, CVD, MOCVD, etc.

Dans ce qui suit, on fera le plus souvent référence au phénomène de résonance des plasmons de surface, pour simplifier la description, mais les spécialistes comprendront aisément que le procédé de l'invention peut s'appliquer sans difficultés à un dispositif utilisant un système à miroir résonant.

Comme indiqué ci-dessus, le procédé de l'invention peut être utilisé notamment en exploitant le phénomène connu de résonance des plasmons de surface (RPS). Ce phénomène est observé lorsqu'un faisceau lumineux subit une réflexion à l'interface verre-métal d'une couche mince métallique, déposée sur la base du prisme. Lorsqu'un ligand pour un analyte d'intérêt est fixé sur la face externe de la couche métallique, et lorsque la couche métallique est mise en contact avec un milieu, liquide

ou gazeux, susceptible de contenir l'analyte, celui-ci, s'il est présent, va se fixer, par affinité, sur le ligand et il en résulte une modification de l'épaisseur des couches moléculaires fixées sur la surface métallique, et donc de l'épaisseur optique, ce qui se traduit, notamment en raison du phénomène RPS, par une variation de la réflectivité de
5 l'interface.

Le phénomène optique de résonance des plasmons de surface a été découvert il y a une trentaine d'année (E. KRETSCHMANN & H. RAETHER; *Z.Naturforsch.*, **23a** (1968), 615-617) et a été utilisé en premier lieu pour la caractérisation quantitative de couches minces non-organiques (W. P. CHEN & J. M.
10 CHEN, *J.Opt.Soc.Am*, **71** (1981), 189-191). Le principe optique repose sur l'accès à la variation de l'épaisseur optique (produit de l'indice de réfraction par l'épaisseur géométrique) via la mesure de la variation de réflectivité sur une interface métal/diélectrique engendrée par la fixation de matière sur la face externe d'une couche métallique. Depuis les années 80, le phénomène de résonance des plasmons de surface
15 est utilisé dans les applications biologiques, notamment dans la caractérisation quantitative d'interactions biologiques. Ainsi, il est possible, au travers de la connaissance de la variation d'indice de réfraction, de remonter jusqu'au nombre de molécules biologiques ayant interagi (J. A. DE FEIJTER *et al.*, *Biopolymers*, **17** (1978), 1759-1772; A. BERNARD *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **230** (1995), 416-423; J.
20 PIEHLER *et al.*, *J. of Immunol. Methods*, **201** (1997), 189-206; P. GUEDON *et al.*, *Anal. Chem.*, (2000) 6003-6009), à leur concentration ainsi qu'aux cinétiques en temps réel caractérisant l'interaction d'analytes avec des ligands préalablement immobilisés sur une couche mince métallique.

Un intérêt du procédé et du dispositif de l'invention réside dans le fait qu'il
25 est possible de déposer localement des ligands différents, de façon régulière, sur la couche sensible, selon un système ordonné (par exemple, matriciel ou bien hexagonal) dans lequel chaque dépôt cantonné sur une faible surface, ou spot, est repérable spatialement (ligands dits « adressés »).

On sait que la variation de la réflectivité liée au phénomène de RPS dépend
30 de l'angle d'incidence du faisceau lumineux subissant la réflexion totale. Le phénomène de réflexion totale sur une interface a lieu lorsqu'une onde lumineuse traversant un milieu d'indice de réfraction n_1 rencontre un milieu d'indice de réfraction n_1 rencontre un milieu d'indice de réfraction n_2 (avec $n_2 < n_1$) avec une incidence α telle que $\alpha > \alpha_c =$

Arcsin(n_2/n_1). Lorsque l'épaisseur de la couche sensible augmente (notamment lorsqu'un analyte vient se fixer sur des ligands immobilisés sur la couche métallique), l'intensité de la lumière réfléchie décroît, puis passe par un minimum, puis croît à nouveau, ce phénomène étant observé pour une variation de l'angle d'incidence de plusieurs degrés. Il est donc souhaitable de repérer, préalablement à la mise en contact avec l'analyte, l'angle d'incidence pour lequel l'intensité de la lumière réfléchie est minimum sur les spots, ce qui se traduit par un contraste notable entre les spots et les zones nues du substrat. La connaissance précise de cet angle pour chaque spot permet la caractérisation de leur état de surface. Il en résulte que, en fonction de la masse molaire de l'analyte ou des analytes, on peut déterminer un angle optimisant la sensibilité de détection pour chaque spot sur lequel un analyte s'est fixé (ou s'est fixé en plus grande quantité).

Lorsque l'épaisseur optique de la couche sensible augmente, par exemple lorsqu'un analyte vient se fixer sur les spots contenant des ligands immobilisés, cela provoque un déplacement du pic de résonance (minimum de réflectivité) vers les angles d'incidence externe décroissants (on appelle ici « angle d'incidence externe » l'angle d'incidence du faisceau lumineux dans le milieu extérieur, avant l'entrée dans le prisme). En choisissant un angle d'incidence externe voisin de l'angle d'incidence initial du pic, mais légèrement supérieur (correspondant à une réflectivité proche du minimum), ce déplacement du pic va entraîner, pour l'angle d'incidence ainsi choisi, une augmentation de la réflectivité, ce qui se traduira sur l'image par l'apparition d'une tache plus lumineuse (ou par la variation du niveau de gris vers les gris plus clairs) tandis que les spots dont l'épaisseur optique n'a pas varié resteront sombres. On peut donc aisément déterminer l'angle d'incidence optimal utilisé conformément au procédé de l'invention, pour lequel la sensibilité de détection est maximale pour l'ensemble des spots dont l'épaisseur optique est susceptible de varier. En effet, à l'état initial, ces spots ont la plupart du temps des pics de résonance très voisins. En outre, comme le balayage angulaire a permis de repérer avec précision l'angle d'incidence du pic de résonance pour chaque spot, à l'état initial, il est possible de déterminer, pour chaque spot, par des moyens informatiques, la valeur exacte du déplacement du pic pour ce spot, et donc de normaliser les résultats recueillis par le détecteur du système d'imagerie qui détecte le flux de photons provenant de chacun des spots.

Dans des modes de réalisation particuliers, le procédé de l'invention peut

encore présenter les caractéristiques, prises isolément ou, le cas échéant, en combinaison, telles que définies dans les revendications.

Pour pouvoir caractériser l'évolution des zones actives de la partie utile, on mesure la réflectivité en fonction du temps, soit de façon continue, soit à des intervalles
5 prédéterminés.

La variation de réflectivité est proportionnelle au nombre de molécules qui se fixent sur les plots, cette fixation correspondant à une augmentation de l'épaisseur sur le plot considéré.

On peut fixer sur la partie utile de la couche sensible, par exemple :

- 10 - des antigènes (pour la recherche d'anticorps spécifiques),
- des peptides aléatoires, pour la recherche de mimotopes spécifiques d'un anticorps donné,
- des anticorps anti-tumeurs, pour la recherche d'antigènes tumoraux dans des broyats de cellule,
- 15 - tous les ligands spécifiques de cellules particulières, pour le tri cellulaire.

Le procédé de l'invention peut également être utilisé pour étudier toutes interactions entre les molécules immobilisées et les analytes, y compris des cellules.

On peut également utiliser le procédé de l'invention pour le criblage de
20 petites molécules qu'on immobilise sur la couche active (par exemple des oligosaccharides) pouvant inhiber le rôle signalétique ou enzymatique d'une protéine (l'analyte est alors la protéine). On sélectionne les petites molécules par l'affinité biologique ou biochimique pour des protéines ou des cellules.

L'invention a également pour objet un dispositif d'imagerie permettant de
25 mettre en œuvre le procédé de l'invention. Ce dispositif peut être utilisé notamment pour l'imagerie de la surface d'une couche sensible portant de multiples capteurs organiques, c'est-à-dire une surface sur laquelle immobilisées une ou plusieurs populations de ligands. Ces capteurs peuvent être déposés sur la couche sensible sous la forme de plots (ou spots) formant une matrice de ligands adressés. Ces spots peuvent
30 être formés soit par dépôts sur la surface de la couche sensible, soit par remplissage de puits réalisés sur la surface de la couche sensible (par exemple par abrasion laser).

Le dispositif de l'invention comprend un dispositif d'imagerie, permettant de mettre en œuvre le procédé de l'une quelconque des revendication précédentes,

comprenant :

- un prisme optique ayant une face d'entrée, une face de sortie et une base munie d'une couche sensible, ledit prisme étant caractérisé par son angle au sommet et par l'indice de réfraction du matériau qui le constitue,
 - 5 – un premier système afocal de conjugaison optique, disposé du côté de la face d'entrée du prisme, et dont l'axe optique, fixe par rapport au prisme, est orienté de façon qu'un faisceau lumineux incident collimaté l'ayant traversé se dirige vers ladite face d'entrée, se réfracte puis frappe la base du prisme où il subit une réflexion totale et ressort après réfraction sur la face de sortie en formant un faisceau émergent, ledit
10 premier système de conjugaison ayant une orientation et une ouverture telles que ledit faisceau incident réfracté sur la face d'entrée vienne éclairer la totalité d'au moins une partie dite utile de ladite couche sensible, et y subir une réflexion totale lorsque la direction du faisceau incident varie, de part et d'autre dudit axe optique, sur une plage angulaire d'au moins 10° au total, ladite partie utile contenant des zones actives dont
15 l'épaisseur optique est susceptible de varier avec le temps,
 - un second système afocal de conjugaison optique disposé du côté de la face de sortie du prisme et dont l'axe optique, fixe par rapport au prisme, est orienté de façon qu'un faisceau incident parallèle à l'axe optique du premier système de conjugaison donne un faisceau émergent parallèle à l'axe optique du second système de
20 conjugaison,
 - un système de détection ayant une surface sensible plane qui est apte à recevoir et à analyser la lumière ayant traversé ledit second système de conjugaison, et qui est perpendiculaire à l'axe optique de celui-ci,
- dans lequel :
- 25 (i) ledit second système de conjugaison a une ouverture telle qu'il est traversé par la totalité de la lumière provenant de la zone utile lorsque la direction du faisceau incident varie sur ladite plage angulaire, et le second système de conjugaison est tel que la totalité de la lumière provenant de la zone utile éclaire la surface sensible du système de détection, et
 - 30 (ii) l'angle au sommet et l'indice du prisme sont tels que lorsque la direction du faisceau incident est parallèle à l'axe optique du premier système de conjugaison, l'image intermédiaire de la partie utile, à travers la face de sortie du prisme, qui constitue l'objet pour le second système de détection, est perpendiculaire à

l'axe optique de celui-ci.

Le balayage angulaire qu'il faut effectuer pour pouvoir observer la résonance en divers points de la zone active, et son déplacement lors de l'évolution du système dans le temps, varie en fonction notamment du métal, du verre, de la longueur
5 d'onde, etc. Il est généralement d'au moins 10° environ.

L'étude de la réflectivité, en fonction de l'angle d'incidence externe, d'une interface métal-diélectrique, nécessite un balayage angulaire généralement compris entre 4 et 10 degrés, environ, suivant la longueur d'onde utilisée et la nature du diélectrique et du métal. Par exemple, avec une interface verre-métal à la base d'un
10 prisme d'angle au sommet $30,6$ degrés, d'indice 1,776 et d'une couche mince d'or de 45 nm d'épaisseur, et une source lumineuse de longueur d'onde 660 nm, il faut, pour décrire totalement la résonance des plasmons de surface, balayer une plage de 8 degrés environ.

En outre, dans le cas où la couche mince métallique est munie d'une
15 pluralité de plots constitués, par exemple, de polymères portant des espèces biologiques immobilisées, la résonance pour l'or est brisée, sur toutes les parties de la couche sensible portant un plot, et la résonance se décale alors vers les angles d'incidence externes décroissants. Par exemple, pour un plot de 3 nm d'épaisseur et d'indice 1,7 à 660 nm, la résonance se décale de 2 degrés environ. Si on met alors en contact la couche
20 sensible avec un fluide contenant des analytes capables d'interagir avec les espèces biologiques immobilisées sur les plots, on observera un nouveau décalage de la résonance pouvant aller jusqu'à 4 degrés environ.

La somme des étendues angulaire à parcourir si l'on veut observer les résonances de l'or, des plots de polymères portant des espèces biologiques, et de
25 certains de ces plots après qu'ils ont interagi avec les analytes, nécessite alors un balayage angulaire total de 14 degrés. Il est souhaiter de pouvoir utiliser un balayage angulaire de 16 degrés, afin de pouvoir travailler avec un certain confort et de pouvoir modifier à loisir les matériaux précités, notamment en termes d'indice et d'épaisseur. Dans certaines applications et avec certains matériaux et certaines longueurs d'onde, la
30 possibilité d'utiliser un balayage angulaire de 10° peut suffire. Mais le dispositif de l'invention permet d'utiliser un balayage angulaire pouvant aller jusqu'à 16° .

La source lumineuse est une source cohérente ou non cohérente. Elle est nécessairement cohérente dans le cas d'un dispositif à guide d'onde.

Le système de collimation peut être tout système optique classique permettant de transformer un faisceau lumineux divergent en faisceau parallèle.

Le système optique déflecteur comprend par exemple un miroir plan tournant, qui peut être monté sur un moteur pas-à-pas ou un moteur à courant continu.

5 On peut également utiliser un miroir de type galvanométrique. On sait que lorsqu'un miroir tournant tourne d'un angle donné, le rayon réfléchi issu d'un rayon incident fixe est dévié d'un angle double dudit angle donné. Le miroir plan tournant peut être notamment apte à pivoter autour d'un axe parallèle à une arête du prisme. On appelle arête du prisme la droite d'intersection des deux plans contenant respectivement les
10 faces d'entrée et de sortie du prisme.

Le dispositif de l'invention peut comprendre un système polarisant, disposé par exemple entre le système de collimation et le miroir tournant, et permettant de polariser la lumière parallèlement à l'arête du prisme. Le système polarisant est par exemple composé d'un simple polariseur ou d'un cube séparateur de polarisation. Dans
15 le cas du système à miroir résonant, un second polariseur est bien entendu nécessaire à la suite du prisme.

Dans des modes de réalisation particuliers, le dispositif de l'invention peut encore présenter les caractéristiques, prises isolément ou, le cas échéant, en combinaison, telles que définies dans les revendications.

20 Dans la présente invention, on désigne par « système dioptrique » une lentille ou un doublet.

Le dispositif de l'invention permet d'effectuer la détection au meilleur angle d'incidence de la variation d'épaisseur optique (produit de l'épaisseur géométrique par l'indice de réfraction du matériau) sur l'interface métal-milieu
25 extérieur, sans avoir à modifier la position des éléments du dispositif qui sont tous fixes les uns par rapport aux autres, à l'exception du miroir tournant. Il est ainsi très facile de faire varier l'angle d'incidence lors d'une étude préliminaire, en actionnant le seul miroir tournant, pour déterminer pour chaque angle d'incidence la réflectivité de la zone sensible, et on peut ensuite effectuer les mesures proprement dites en immobilisant le
30 miroir tournant sur la position correspondant à cet angle d'incidence optimal prédéterminé.

En effet, selon un mode de réalisation particulier, le dispositif optique d'imagerie de l'invention est tel que l'image de la zone utile de la couche mince

métallique occupe une surface maximale de la matrice de détection CCD, de sorte que c'est l'ensemble de la surface de la zone utile de la couche métallique qui peut être analysée simultanément grâce à la matrice CCD.

Une caractéristique importante pour que le dispositif de détection puisse
5 recevoir tous les rayons lumineux provenant de l'image de la surface utile de la couche mince métallique, bien que le système d'imagerie et le système de détection soient fixes par rapport au prisme, est que le dispositif de l'invention comprend un système de conjugaison optique tel que le faisceau qui, après entrée dans le prisme, vient frapper la couche mince métallique, éclaire la totalité de la surface utile de la matrice CCD, et cela
10 quel que soit l'angle d'incidence dudit faisceau sur ladite plage angulaire pouvant atteindre jusqu'au moins 16° environ. Un tel système de conjugaison optique peut être mis au point, par exemple, de façon connue, en utilisant un dispositif dont le nombre d'ouverture, c'est-à-dire le rapport de la focale sur le diamètre utile de l'optique, est inférieur à $N = 1/(2 \cdot \sin(16^\circ/2)) = 3,6$ pour accepter tous les faisceaux réfléchis par la
15 zone sensible. sur la plage angulaire d'au moins 16° . Le système de conjugaison peut par exemple être constitué d'une première lentille de focale 80 mm et de diamètre 31,5 mm et d'une deuxième lentille de focale 65 mm et de diamètre 25 mm (l'ensemble présentant une ouverture de 2,6), lesdites lentilles étant disposées de telle façon que l'image de la partie utile par la face de sortie du prisme soit à peu près dans le plan focal
20 objet de la première lentille, que le plan focal image de la première lentille soit confondu avec le plan focal objet de la deuxième lentille et enfin que la matrice CCD se situe dans le plan focal image de la deuxième lentille ; de cette manière, on a constitué un dispositif afocal qui conjugue. On peut aussi par exemple utiliser une troisième lentille, communément appelée "lentille de champ" qui permet de ramener les faisceaux
25 vers l'axe optique, augmentant ainsi l'ouverture du système par rapport à un système afocal à deux lentilles (voir M. BORN & E. WOLF, Principles of Optics, Chapter VI, Pergamon Press, 1959).

Une autre caractéristique importante d'un mode de réalisation particulier du dispositif de l'invention, qui permet une analyse de chaque spot de la partie utile avec
30 une sensibilité satisfaisante, est que l'angle au sommet et l'indice du prisme sont choisis de façon que l'image intermédiaire de la zone utile formée dans le prisme (c'est-à-dire l'image de la surface utile à travers le dioptré plan formé par la face de sortie du prisme, et qui constitue l'objet pour le système optique d'imagerie recevant le faisceau

émergent) fournit dans le système optique d'imagerie une image coïncidant avec le plan focal du système de détection (matrice CCD), ou une image très voisine de ce plan et parallèle à celui-ci, ou ayant par rapport à ce plan une inclinaison suffisamment faible pour éviter, sur la totalité de la surface, le flou de l'image.

5 On sait que tout système optique d'imagerie présente une certaine profondeur de champ, c'est-à-dire une plage longitudinale, suivant l'axe optique défini par le détecteur (cet axe optique étant perpendiculaire au plan du détecteur) pour laquelle l'image apparaîtra nette sur le détecteur. La profondeur de champ dépend directement de la focale du système optique et de son ouverture. Ainsi, pour une focale
10 donnée, la profondeur de champ augmente avec le nombre d'ouverture (rapport de la focale au diamètre d'une optique). Mais il faut par ailleurs que le nombre d'ouverture soit le plus faible possible pour laisser passer un maximum de rayons à travers le système, et permettre ainsi une acceptation angulaire importante. Ces deux conditions étant contradictoires, il est nécessaire de trouver un compromis.

15 Pour obtenir une image nette sur le détecteur, il faut que l'inclinaison de l'image de la zone utile par la face de sortie du prisme par rapport à un plan perpendiculaire à l'axe optique soit suffisamment faible pour qu'il ne soit pas en dehors de la profondeur de champ définie par le système de détection. Or, l'inclinaison du faisceau incident dans ce système rend nécessaire un redressement de l'image par un
20 dispositif optique approprié, ce qui peut se réaliser soit en inclinant l'optique du système d'imagerie, soit en inclinant le système de détection (caméra CCD) afin d'avoir l'image de toute la surface nette sur le détecteur CCD.

Le problème de l'inclinaison de l'optique implique que ladite optique soit très ouverte pour laisser passer tous les rayons à travers cette optique, car les angles mis
25 en jeu peuvent être relativement importants ; par exemple, pour un prisme isocèle d'indice 1,515 et d'angle au sommet 60° , cela impose un nombre d'ouverture du système de détection de 0,55, ce qui est rédhibitoire car un tel système présente beaucoup d'aberrations et une profondeur de champ très faible. De manière similaire, l'inclinaison de la caméra engendrerait une perte de netteté due au fait que le système ne
30 travaillerait plus dans de bonnes conditions d'imagerie, car on ne peut plus parler alors d'aplanétisme.

L'originalité du prisme et des optiques utilisés dans un mode de réalisation du dispositif de la présente demande réside dans le fait que, quel que soit l'angle

d'incidence du faisceau au niveau de l'interface prisme/couche sensible (dans les limites de variation indiquées pour l'angle d'incidence sur la face d'entrée du prisme), l'inclinaison de l'image intermédiaire par la face de sortie du prisme varie peu et reste quasiment perpendiculaire à l'axe optique du système de détection. Ainsi, un rayon
5 totalement réfléchi partant du centre de la zone utile présentera à la sortie du prisme un angle faible par rapport à l'axe optique du système d'imagerie, tandis que le point image correspondant sur le détecteur restera à peu près dans les limites de la profondeur de champ définie par ce système.

Un intérêt majeur du dispositif de l'invention est que la totalité des éléments
10 optiques sont fixes (à l'exception du miroir tournant) et les optiques sont peu ouvertes (elles présentent de ce fait moins d'aberrations et autorisent une profondeur de champ importante), et cela sans altérer les performances de mise au point et d'acceptance angulaire, pouvant aller notamment jusqu'à 16°, du système.

D'autres objets et avantages de l'invention apparaîtront au cours de la
15 description suivante en référence aux dessins annexés donnés à titre d'exemple non limitatif, dans lesquels :

- la figure 1 représente un schéma du dispositif selon l'invention,
- la figure 2 représente un schéma de la cellule de réaction selon l'invention.

20 Le dispositif selon l'invention comprend :

- une source lumineuse 1,
- un premier système de collimation 2 du faisceau lumineux incident émis par la source lumineuse,
- une cellule de réaction 3 comprenant au moins un prisme 4,
- 25 - un système d'imagerie et de détection 5 du faisceau réfléchi par la base du prisme.

La source lumineuse 1, non cohérente, est par exemple une diode électroluminescente de largeur spectrale étroite. Il peut s'agir par exemple d'une diode électroluminescente de longueur d'onde 660 nanomètres et de largeur spectrale 30
30 nanomètres.

Le faisceau émis par la source lumineuse 1 est collimaté par un système de collimation 2. Ce système de collimation 2 est par exemple un système de deux objectifs de microscope permettant de rendre le faisceau lumineux parallèle.

La lumière est ensuite polarisée par un polarisateur 6 afin de pouvoir exciter le plasmon de surface.

Cette lumière polarisée éclaire la face d'entrée d'un prisme en verre 4 de la cellule de réaction 3.

5 Dans un mode de réalisation, la lumière polarisée est réfléchiée par un miroir galvanométrique oscillant 7 vers la face d'entrée du prisme 4 tel que représenté sur la figure 1. Le miroir oscillant 7 est conjugué sur la base du prisme à l'aide de deux lentilles 8 et 9. On peut ainsi faire varier l'angle d'incidence du faisceau sur le prisme par la rotation du miroir oscillant 7 autour d'un axe 7a perpendiculaire au plan du
10 dessin. Le miroir oscillant 7 subit une rotation partielle, contrôlée par exemple par un générateur basse fréquence.

Le mouvement de rotation du dispositif de rotation du miroir oscillant 7 peut être discrétisé à l'aide d'une composante continue afin de pouvoir fixer l'angle auquel on souhaite réaliser les expériences.

15 Le diamètre du miroir 7 est tel qu'il permet de réfléchir la totalité du faisceau incident sur le prisme 4.

Dans le mode de réalisation considéré, le diamètre est au moins de 10 mm. La course totale du miroir 7 est de 16° pour une fréquence de 300 mégahertz. Lors de sa rotation, le miroir oscillant 7 a une course continue à fréquence fixe.

20 Les lentilles 8, 9 utilisées pour conjuguer le miroir 7 avec le prisme 4 peuvent être par exemple des lentilles de focale $F' = 75$ mm avec un diamètre de 35 mm pour une excursion de 19° , ou des lentilles de focale $F' = 50$ mm avec un diamètre de 25 mm pour une excursion de 17° .

Dans la figure 1, on a représenté en traits pleins les limites du faisceau lumineux pour la position du miroir 7 représentée, et en traits interrompus les limites extrêmes de ce faisceau lorsque le miroir 7 occupe les positions extrêmes de sa course angulaire.

L'angle d'incidence du faisceau réfléchi par le miroir 7 sur le prisme 4 peut être déterminé de deux manières différentes.

30 Dans un premier mode de réalisation, la partie du faisceau réfléchi par la face d'entrée du prisme est recueillie par une barrette de circuits à couplage de charge CCD 10 de longueur suffisante.

Cette barrette CCD 10 permet de détecter l'incidence du faisceau.

Le faisceau ainsi réfléchi par la face d'entrée du prisme est focalisé sur la barrette CCD 10 à l'aide d'une lentille 11 dont la focale est choisie de façon à utiliser toute la surface de la barrette 10.

Pour une barrette CCD 10 de longueur $L = 12,7$ mm composée de 512 pixels, on peut par exemple utiliser une lentille 11 de focale $F' = 48$ mm et de diamètre 30 mm.

Dans un autre mode de réalisation, non représenté, la rotation du miroir oscillant 7 est assurée par un moteur permettant de déterminer la position d'incidence pour chaque position du miroir. On peut par exemple utiliser un moteur à pas variable.

La cellule de réaction 3 comprend au moins un prisme 4 en verre dont la géométrie et l'indice sont tels que l'image intermédiaire du plan objet dans le prisme 4 est quasiment parallèle au plan de détection du système d'imagerie et de détection 5.

Dans un mode de réalisation, le prisme est en verre d'indice 1,8 et a pour caractéristique un angle au sommet de 40° , une base de 10 mm de largeur et 25 mm de hauteur. La distance entre les deux faces parallèles du prisme est de 8 mm.

Une lame de verre 12 de même indice que le prisme 4 est fixée sur la base du prisme au moyen d'une huile d'adaptation d'indice.

Sur cette lame de verre 12, sont déposées successivement une couche mince de chrome 13, une couche mince d'or 14, et une couche à caractériser 15.

La couche de chrome 13 permet d'assurer l'adhésion de la couche d'or 14 sur la lame de verre 12 en présence d'un milieu aqueux. L'épaisseur de la couche mince de chrome 13 est comprise par exemple entre 1,5 et 2 nanomètres.

L'épaisseur de la couche mince d'or 14 est par exemple comprise entre 40 et 50 nanomètres et de préférence de l'ordre de 45 nanomètres.

Pour une application à une mesure qualitative et quantitative d'interactions moléculaires, la couche à caractériser est, par exemple, une couche organique 15.

La couche organique 15 peut être déposée sous forme d'une couche continue ou sous forme de spots ou plots, comme indiqué ci-dessus. Dans le cas d'une couche continue, contenant une seule sorte de ligand (par exemple un anticorps), il convient de déposer ponctuellement des solutions d'analytes (par exemple peptides pour la recherche de minotopes) sous forme de spots, puis on rince pour éliminer les analytes non fixés spécifiquement.

Dans le cas d'une couche organique sous forme de spots, on peut mettre la

couche sensible en contact avec un fluide contenant un analyte à étudier.

Les ligands sont immobilisés sur la couche d'or de façon connue.

Par exemple, pour l'étude d'interactions entre des oligonucléotides et des fragments d'ADN simple-brin à étudier, la couche organique 15 utilisée pour la fixation d'oligonucléotides sur la couche d'or 14 par l'intermédiaire est un polymère tel que par exemple le polypyrrole, les oligonucléotides étant greffés sur le polypyrrole. Ce polymère présente l'avantage d'être très stable, ce qui permet de réutiliser plusieurs fois la couche organique 15 comprenant les sondes (oligonucléotides immobilisés). La réalisation et le dépôt d'une telle couche de polypyrrole greffé sur une couche d'or sont par exemple décrits dans les brevets EP 0 691 978 et FR 2 789 401.

Une fois la lame de verre 12 fixée sur la base du prisme 4, elle est recouverte hermétiquement d'une cuve 16.

Cette cuve 16 est par exemple en Téflon et permet de faire passer des solutions d'analytes à l'aide d'un ou plusieurs tuyaux 17. Une pompe péristaltique 18 à débit variable peut alors être utilisée pour faire circuler ces solutions.

Afin d'optimiser l'introduction des solutions, la pompe péristaltique 18 répond aux critères suivants :

- être commandable à distance ;
- être capable de générer des débits compris entre quelques micro litres par minute et quelques centaines de micro litres par minute (de l'ordre de 300 à 400 micro litres/min) ;
- permettre une commande entrée/sortie de la vitesse de rotation du début et de la fin de l'injection.

L'ensemble de la cellule de réaction 3 (prisme 4 et cuve 16) peut être enfermé dans une enceinte adiabatique 19 représentée figure 2, afin de contrôler et de fixer la température du système et des produits injectés.

La température sera par exemple maintenue à 37° afin de permettre la détection de tout type de molécules biologiques.

L'enceinte adiabatique 19 comprend de préférence une ouverture (non représentée) permettant d'accéder facilement à la cellule de détection 3.

Elle peut comporter notamment un socle 20 chauffant, tel que par exemple une résistance en cuivre, sur laquelle sera fixée la cuve de réaction en Téflon 16. Ce socle 20 est recouvert d'un couvercle 21 englobant l'ensemble de la cellule de détection

3.

Des hublots latéraux 22, 23 sont prévus dans le couvercle 21 afin de laisser passer les faisceaux lumineux de part et d'autre du prisme. Ils sont par exemple en verre ou tout autre matériau laissant passer les faisceaux lumineux sans les perturber.

5 Un bobinage non représenté enroulé autour du tuyau 17 de la cuve 16 permet de maintenir les produits injectés à la température de la cellule.

Un système d'imagerie et de détection 5 est disposé du côté de la face de sortie du prisme 4 afin de récupérer le faisceau réfléchi par la base de ce dernier.

10 Ce système comprend un système afocal de conjugaison et de grandissement 24 et une caméra CCD 25.

Le système afocal de grandissement 24 permet ici d'agrandir l'image de la zone utile de la lame d'or 14 sur l'ensemble de la caméra CCD 25.

La zone utile de la lame d'or 14 est par exemple de l'ordre de 25 mm² environ.

15 Dans le mode de réalisation représenté, un agrandissement $G=1,6$ est réalisé et un système d'ouverture numérique $O.N. = 1,6$ est utilisé pour conjuguer l'image sur le plan de la caméra CCD 25.

20 Le système afocal 24 peut par exemple comprendre une lentille 26 de focale $F' = 50$ mm et de diamètre 35 mm, puis une autre lentille 27 de focale $F' = 80$ mm et de diamètre 40 mm.

La lentille 26 est disposée de façon telle que l'image de la partie utile de la couche active après réfraction sur la face de sortie du prisme est située dans le plan focal objet de 26. Il en résulte que l'image se forme dans le plan focal image de la lentille 27.

25 Le système de conjugaison peut aussi être constitué par exemple d'une première lentille de focale 80 mm et de diamètre 31,5 mm, et d'une seconde lentille de focale 65 mm et de diamètre 25 mm (l'ensemble présentant une ouverture de 2,6). Pour concevoir ce système optique, on peut utiliser des logiciels de calculs optiques commerciaux tels que CODE V (Optical Research Associates).

30 La caméra CCD 25 (ou simplement une matrice CCD) peut par exemple présenter une surface sensible de 6,4 mm x 5,8 mm composée de 768 x 576 pixels.

Le détecteur CCD peut également être par exemple une caméra à tête déportée de format 1,5 pouce, de surface sensible 6,4 x 4,8 mm², comprenant 751 x 582 pixels actifs, avec un signal échantillonné sur 8 bits, ou bien une caméra compacte de

format 2/3 pouce, de surface sensible 8,57 x 6,86 mm², comprenant 1280 x 1024 pixels actifs avec un signal échantillonné sur 12 bits. Il s'agit de caméras commerciales.

Tous les éléments du dispositif selon l'invention sont contrôlés automatiquement au moyen d'une chaîne informatique non représentée.

5 Le procédé d'utilisation dudit dispositif comprend les étapes suivantes :

- balayage en angle de la surface de la lame de verre 12 recouverte de la couche d'or 14 et de la couche à caractériser 15 ;
- détermination de l'angle d'incidence pour lequel la sensibilité du système d'imagerie et de détection 5 est maximale pour l'ensemble de la lame 12 ;
- 10 - positionnement du miroir oscillant 7 pour obtenir cet angle d'incidence ;
- mesure de la réflectivité par le système d'imagerie et de détection 5 en fonction du temps.

Le dispositif est alors utilisé pour caractériser la surface des zones actives à caractériser de la couche 15.

15 Le dispositif peut être appliqué à l'étude d'interactions moléculaires.

Afin de mesurer les interactions entre la couche organique 15 et des analytes, l'étape de mesure de la réflectivité est réalisée simultanément à l'introduction dans la cellule de réaction 3 d'analytes (non marqués) dont les interactions avec les ligands de la couche organique 15 sont à analyser.

20 On mesure ainsi l'évolution des interactions entre la couche organique 15 et les analytes introduits.

Ces mesures peuvent être réalisées dans des conditions non sélectives, de sorte que toutes les interactions peuvent se produire et être étudiées.

25 Le système d'imagerie et de détection 5 permet de mesurer l'épaisseur optique, produit de l'épaisseur géométrique et de l'indice de réfraction du milieu, en tout point de la partie utile de la couche d'or 14.

Il est ainsi possible de visualiser topologiquement les zones d'égale épaisseur optique et de caractériser la surface.

30 Ainsi, lors du balayage en angle de la surface de la lame de verre 12 couverte de la couche d'or 14, le système 5 permet de déterminer l'épaisseur géométrique de chaque point de la couche 14 et donc de vérifier l'état de surface de celle-ci.

Le contraste mesuré lors du balayage sert par ailleurs de niveau de référence

pour la mesure en temps réel.

Lors de la mesure en temps réel, le système d'imagerie et de détection 5 mesure la variation de la réflectivité par rapport au niveau de référence enregistré lors du balayage angulaire.

5 Cette mesure de la variation de la réflectivité est réalisée en tout point de la partie utile de la couche d'or 14.

La réflectivité variant en fonction des espèces moléculaires présentes en surface, cette mesure permet une analyse qualitative en déterminant les différentes interactions entre la couche organique 15, la couche d'or 14 et les molécules introduites.

10 Ainsi, lorsque l'on se place à l'angle optimisant la sensibilité du dispositif, une variation positive de la réflectivité signifie la présence d'analytes en interaction avec les ligands de la couche organique 15, une variation nulle signifiant l'absence d'analyte interagissant.

Une variation négative représente alors au contraire une perte de matière, 15 c'est-à-dire une dégradation de la couche 15.

La mesure de l'amplitude de la variation de la réflectivité en temps réel permet quant à elle d'accéder au nombre de molécules d'analytes par unité de surface et donc à la concentration en chaque point (sur chaque spot) de la couche d'or 14 des molécules d'analyte introduites.

20 Le dispositif selon l'invention permet donc également une analyse quantitative des molécules ayant interagi avec les ligands de la couche 15.

Selon la force de la liaison entre la couche 15 et la couche d'or 14 et la nature des interactions étudiées, il sera possible en fin de mesure de régénérer la couche organique 15 en éliminant toutes les molécules d'analyte ayant réagi avec elle.

25 Il est alors possible de réutiliser la couche 15 pour étudier des interactions avec de nouvelles molécules d'analytes.

Afin d'optimiser la sensibilité de la mesure, on peut également optimiser la répartition des spots fixés sur la couche 15. Il est en effet nécessaire que le nombre de sondes (ligands) par spot soit suffisamment élevé pour se distinguer du bruit de fond du 30 signal mesuré, sans pour autant que les sondes soient trop proches les uns des autres. En effet, un nombre important de sondes entraîne un encombrement stérique important et gêne l'interaction de molécules avec des sondes voisines. Dans le cadre de l'étude d'interactions entre oligonucléotides et des fragments d'ADN simple-brin à étudier le

procédé selon l'invention présente de nombreux avantages. Les interactions sont étudiées dans des conditions d'hybridation non sélectives, par exemple à une température de l'ordre de 37°C, de sorte que toutes les interactions entre les réactifs pourront être observées simultanément.

5 Le dispositif permet de suivre en même temps et sans marqueurs plusieurs centaines d'interactions moléculaires à la fois. Il est capable notamment de discriminer la présence d'une mutation ponctuelle au sein d'un fragment d'ADN.

La technique de discrimination repose sur le fait que l'association moléculaire peut être soit totale si la séquence de l'ADN est strictement complémentaire de celle de l'oligonucléotide, soit partielle si la séquence d'ADN possède une base mutée.

La thermodynamique appliquée à l'ADN montre que suivant le type de mutation, pour une localisation fixe dans la séquence, l'épaisseur optique varie. Il s'ensuit que le dispositif peut déterminer précisément le type de mutation.

15 Dans des conditions non sélectives, si une séquence normale et les trois séquences portant la mutation d'une des bases de ladite séquence, c'est-à-dire les quatre séquences dont l'une des bases a été mutée, sont déposées sous forme de quatre plots différents sur la couche d'or 14, le dispositif peut mesurer un signal différent pour chacune des séquences immobilisées.

20 En effet, quelle que soit la séquence du fragment à analyser, le dispositif mesure une interaction totale et trois interactions partielles.

En fonction des séquences immobilisées, il suffit alors de se reporter aux tables existant donnant la force d'interaction entre bases pour remonter à la nature exacte de la séquence d'ADN.

25 Dès lors, si le système de détection est calibré, par exemple par rapport à la valeur d'un signal totalement complémentaire, il n'est plus nécessaire d'immobiliser la séquence normale et les trois séquences mutées : l'immobilisation d'une seule séquence est suffisante.

La capacité d'adresser des séquences d'ADN sur un substrat solide est donc multipliée par quatre.

30 Le dispositif selon l'invention suivant en temps réel et directement les interactions moléculaires, il n'est pas nécessaire de réaliser la mesure à une température favorisant une seule interaction comme dans le cas des méthodes utilisant des

marqueurs fluorescents.

En effet, ces méthodes ne permettent de révéler qu'une seule interaction visible à une température donnée. Si ces méthodes étaient employées à température ambiante, tous les marqueurs émettraient de la fluorescence en même temps et ne
5 pourraient donc être différenciés.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

Exemples de configuration de prismes

- 1) Données pour un verre d'indice $n=1,776$:
10
 - Matériau : SF11 (fournisseur : SCHOTT).
 - Angle au sommet optimal : $30,6^\circ$.
 - Coefficient d'anamorphose : 0,479.
 - Rapport entre la taille des aberrations et la taille de l'image : 4,17 %.
- 2) Données pour un verre d'indice $n=2,20$:
15
 - Matériau : niobate de lithium LiNbO₃ (fournisseur : CRYSTAL TECHNOLOGY, Inc., Palo Alto CA).
 - Angle au sommet optimal : $77,4^\circ$.
 - Coefficient d'anamorphose : 0,7.
 - 20 - Rapport entre la taille des aberrations et la taille de l'image : 1,57 %.
- 3) Données pour un verre d'indice $n=3,33$:
25
 - Matériau : GaAs (fournisseur : AXT, Inc., Palo Alto CA).
 - Angle au sommet optimal : $123,7^\circ$.
 - Coefficient d'anamorphose : 0,89.
 - Rapport entre la taille des aberrations et la taille de l'image : 0,5 %.

Le dimensionnement des prismes a été réalisé à l'aide du logiciel MATLAB (société MATH WORKS), qui permet d'établir des algorithmes appropriés, selon des méthodes connues. Pour un indice n donné, il existe au moins un angle au sommet
30 permettant que l'image intermédiaire de la base du prisme à travers de la face de sortie soit perpendiculaire à l'axe optique du second système afocal de conjugaison. On recherche ensuite de la même façon les couples (indice – angle au sommet) qui donnent un débattement angulaire minimum pour cette image intermédiaire.

Les prismes peuvent être également réalisés à l'aide de monocristaux tels que le tantalate de lithium (LiTaO_3), le niobate de lithium (LiNbO_3).

Il s'agit de matériaux biréfringents, c'est-à-dire qu'ils peuvent présenter un indice différent suivant l'état de polarisation de la lumière. Cet inconvénient peut être surmonté par exemple en orientant les axes du cristal de façon que l'indice de réfraction effectif, en polarisation transverse magnétique, soit le même quel que soit l'angle d'incidence du faisceau sur la zone utile.

Une autre solution est d'utiliser des matériaux semi-conducteurs tels que l'arséniure de gallium, le germanium (indice de l'ordre de 4) ou encore le silicium (indice d'environ 3,9).

Tous ces matériaux présentent une bonne transmission dans l'infrarouge, ce qui est favorable compte tenu des caractéristiques intéressantes des plasmons de surface à des longueurs d'onde élevées.

15 Exemples d'applications :

1) Discriminations de mutations ponctuelles

On dispose d'une zone sensible munie de quatre séquences d'ADN de 25 bases de long, une séquence normale ou native (WT) du gène K-ras, une séquence test (CP) qui servira de témoin négatif et deux séquences mutées, M1 et M5 qui ne diffèrent de la séquence native que d'une seule base sur le même codon.

On sait que les mutations du gène K-ras engendrent presque systématiquement un cancer, d'où la nécessité d'identifier les individus possédant une mutation.

25 Ces quatre séquences ont été immobilisées, sous la forme de quatre plots, de façon covalente, par un procédé électrochimique décrit dans les demandes de brevet WO 94/22889 et WO 00/47317.

La première étape consiste à étudier la réflectivité de la zone sensible en fonction de l'incidence externe, pour déterminer l'angle où se placer pour observer les hybridations avec un maximum de sensibilité. Ensuite, on injecte la séquence complémentaire de CP, dans un tampon d'hybridation à 22 °C (BPS, NaCl 137 mM), afin de démontrer que seul le plot CP réagit, ce qui est le cas. L'expérience ayant garanti par l'étape précédente que le système est sélectif, on injecte ensuite, après avoir

5 régénéré le système avec une solution d'hydroxyde de sodium 50 mM, la séquence complémentaire de WT, qui réagit très bien avec le plot WT, peu avec les deux plots correspondants aux séquences mutées et pas du tout avec le plot CP. Puis on régénère et on injecte la séquence complémentaire de M1, qui réagit très bien avec le plot M1, peu avec WT et M5 et pas du tout avec CP. La dernière injection donne les résultats attendus : le complémentaire de M5 réagit très bien avec M5, peu avec WT et M1 et pas avec CP.

10 On peut mesurer les affinités pour chacune de ces hybridations et affirmer que suivant le nombre de molécules ayant interagi sur les plots natifs ou mutés, et suivant la valeur de l'affinité, on peut discriminer de cette manière une mutation ponctuelle et même identifier le type de mutation.

15 Après établissement des courbes de réflectivité étalons, en fonction du temps, pour les quatre types d'hybridation, on peut détecter, par comparaison, une mutation ponctuelle avec seulement deux sondes, comme indiqué dans la description.

2) Analyse d'interactions protéine-protéine

20 On dispose d'une zone sensible munie de quatre plots dont trois portent des anticorps. Deux anticorps sont dirigés contre l'hCG, hormone de grossesse humaine qui, quand elle est détectée chez l'homme, est très souvent indicatrice d'un cancer des testicules. Le troisième anticorps est un anticorps anti-lapin, qui ne croise pas avec l'homme. Il a été simplement absorbé sur un plot de polymère. Le dernier plot ne contient que du polymère, sans anticorps.

25 On injecte d'abord de l'albumine sérique bovine, qui limite l'adsorption passive de molécules non spécifiquement reconnues, jusqu'à saturation. On injecte ensuite l'hCG dans un tampon PBS. Le plot ne portant que du polymère a une cinétique nulle (aucune évolution de la réflectivité en fonction du temps). Le plot portant l'anticorps anti-lapin a une cinétique qui décroît ; cela signifie que les anticorps, faiblement liés aux polymères, sont désorbés et évacués de la cuve de réaction. Les deux autres plots ont chacun une cinétique de forme exponentielle, signe de la reconnaissance de l'hCG par les anticorps. Toutefois, les deux anticorps anti-hCG étant différents, on 30 note une différence de la pente à l'origine des cinétiques d'interaction. En effet, leur affinité pour l'hCG n'est pas la même. Pour l'un des anticorps, on a déduit des résultats de réflectivité que l'affinité est de 8.10^{-10} , soit la même valeur que celle mesurée

indépendamment par une technique ELISA.

L'invention a également pour objet l'application du procédé décrit ci-dessus à la mesure qualitative et quantitative d'interaction moléculaire telles que décrites dans la présente demande.

REVENDICATIONS

1. Procédé de caractérisation de la surface d'une couche sensible, ladite surface comportant des zones actives dont l'épaisseur optique est susceptible de varier
5 avec le temps, ladite couche sensible étant déposée sur la base d'un prisme optique, ledit procédé utilisant une technique fondée sur l'analyse de la variation de la réflectivité de l'interface prisme - couche sensible, dans lequel :

a) on fait entrer dans le prisme, par une face d'entrée, un faisceau lumineux collimaté avec un angle d'incidence permettant la réflexion totale sur la base du prisme,
10 ledit faisceau éclairant une partie fixe de l'interface correspondant à une partie à caractériser, appelée partie utile, de ladite surface, et le faisceau réfléchi ressortant en faisceau émergent par la surface de sortie du prisme,

b) on effectue un balayage en angle de la partie utile, en faisant varier l'angle d'incidence dudit faisceau, de façon à repérer une incidence pour laquelle la
15 réflectivité d'au moins une partie, ou de la totalité, des zones actives, est minimum,

c) on détermine un angle d'incidence optimal, pour lequel la sensibilité de détection des zones actives est maximale,

d) on règle l'incidence à la valeur optimale déterminée à l'étape précédente,

20 e) et on mesure la réflectivité à l'aide d'un système d'imagerie et de détection ayant une surface sensible apte à recevoir la totalité du faisceau émergent provenant de la partie utile.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel, après l'étape d), on met en contact avec ladite couche sensible un fluide contenant ou susceptible de contenir au
25 moins un analyte capable de se lier avec une population de ligands immobilisés sur les zones actives.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel on mesure, à l'étape e), la variation de la réflectivité des zones actives en fonction du temps.

4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel on utilise les résultats
30 desdites mesures pour caractériser de façon quantitative les interactions d'au moins un couple ligand/analyte correspondant, l'analyte correspondant étant celui auquel le ligand est capable de se lier.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, dans lequel les

ligands et/ou les analytes sont choisis parmi des oligonucléotides de type sauvage ou muté, des protéines de type sauvage ou mutée, des fragment de protéine, des oligopeptides de séquence aléatoire, des anticorps ou fragments d'anticorps, des antigènes non protéiques, des haptènes, des agonistes ou antagonistes de ligands
5 naturels, des cellules, des récepteurs biologiques et des oligosaccharides.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel on utilise comme ligands un oligonucléotide de type sauvage et un oligonucléotide muté ayant une mutation ponctuelle quelconque dans une position donnée, et on utilise comme analyte un fragment d'ADN dans lequel on recherche une
10 mutation dans ladite position donnée, on compare les courbes de réflectivité obtenues avec des courbes de réflectivité pré-établies pour le type sauvage et les 3 mutations possibles à ladite position, et on en déduit la mutation présente dans l'analyte, dans le cas où il présente une mutation à ladite position.

7. Dispositif d'imagerie, permettant de mettre en œuvre le procédé de l'une
15 quelconque des revendication précédentes, comprenant :

- un prisme optique ayant une face d'entrée, une face de sortie et une base munie d'une couche sensible, ledit prisme étant caractérisé par son angle au sommet et par l'indice de réfraction du matériau qui le constitue,
- un premier système afocal de conjugaison optique, disposé du côté de la face
20 d'entrée du prisme, et dont l'axe optique, fixe par rapport au prisme, est orienté de façon qu'un faisceau lumineux incident collimaté l'ayant traversé se dirige vers ladite face d'entrée, se réfracte puis frappe la base du prisme où il subit une réflexion totale et ressort après réfraction sur la face de sortie en formant un faisceau émergent, ledit premier système de conjugaison ayant une orientation et une ouverture telles que ledit
25 faisceau incident réfracté sur la face d'entrée vienne éclairer la totalité d'au moins une partie dite utile de ladite couche sensible, et y subir une réflexion totale lorsque la direction du faisceau incident varie, de part et d'autre dudit axe optique, sur une plage angulaire d'au moins 10° au total, ladite partie utile contenant des zones actives dont l'épaisseur optique est susceptible de varier avec le temps,
- un second système afocal de conjugaison optique disposé du côté de la
30 face de sortie du prisme et dont l'axe optique, fixe par rapport au prisme, est orienté de façon qu'un faisceau incident parallèle à l'axe optique du premier système de conjugaison donne un faisceau émergent parallèle à l'axe optique du second système de

conjugaison,

- un système de détection ayant une surface sensible plane qui est apte à recevoir et à analyser la lumière ayant traversé ledit second système de conjugaison, et qui est perpendiculaire à l'axe optique de celui-ci,

5 dans lequel :

(iii) ledit second système de conjugaison a une ouverture telle qu'il est traversé par la totalité de la lumière provenant de la zone utile lorsque la direction du faisceau incident varie sur ladite plage angulaire, et le second système de conjugaison est tel que la totalité de la lumière provenant de la zone utile éclaire la surface sensible
10 du système de détection, et

(iv) l'angle au sommet et l'indice du prisme sont tels que lorsque la direction du faisceau incident est parallèle à l'axe optique du premier système de conjugaison, l'image intermédiaire de la partie utile, à travers la face de sortie du prisme, qui constitue l'objet pour le second système de détection, est perpendiculaire à
15 l'axe optique de celui-ci.

8. Dispositif selon la revendication 7, dans lequel l'angle au sommet et l'indice du prisme sont tels que lorsque la direction du faisceau incident varie sur ladite plage angulaire, le débattement angulaire de l'image intermédiaire de la zone utile formée à travers la face de sortie ne dépasse pas les limites de la profondeur de champ
20 du second système de conjugaison.

9. Dispositif selon la revendication 7 ou 8, dans lequel ladite plage angulaire est d'au moins 12° , ou d'au moins 14° , ou d'au moins 16° .

10. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, dans lequel le grandissement du second système de conjugaison est tel que la totalité de la lumière
25 provenant de la zone utile éclaire la totalité de la surface sensible du système de détection.

11. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, dans lequel ledit second système afocal comprend un premier système dioptrique, par lequel le faisceau émergent entre, et un second système dioptrique par lequel la lumière ressort
30 pour se diriger vers la surface sensible du système de détection, et dans lequel ladite image intermédiaire à travers la face de sortie du prisme est dans le plan objet dudit premier système dioptrique.

12. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, dans lequel

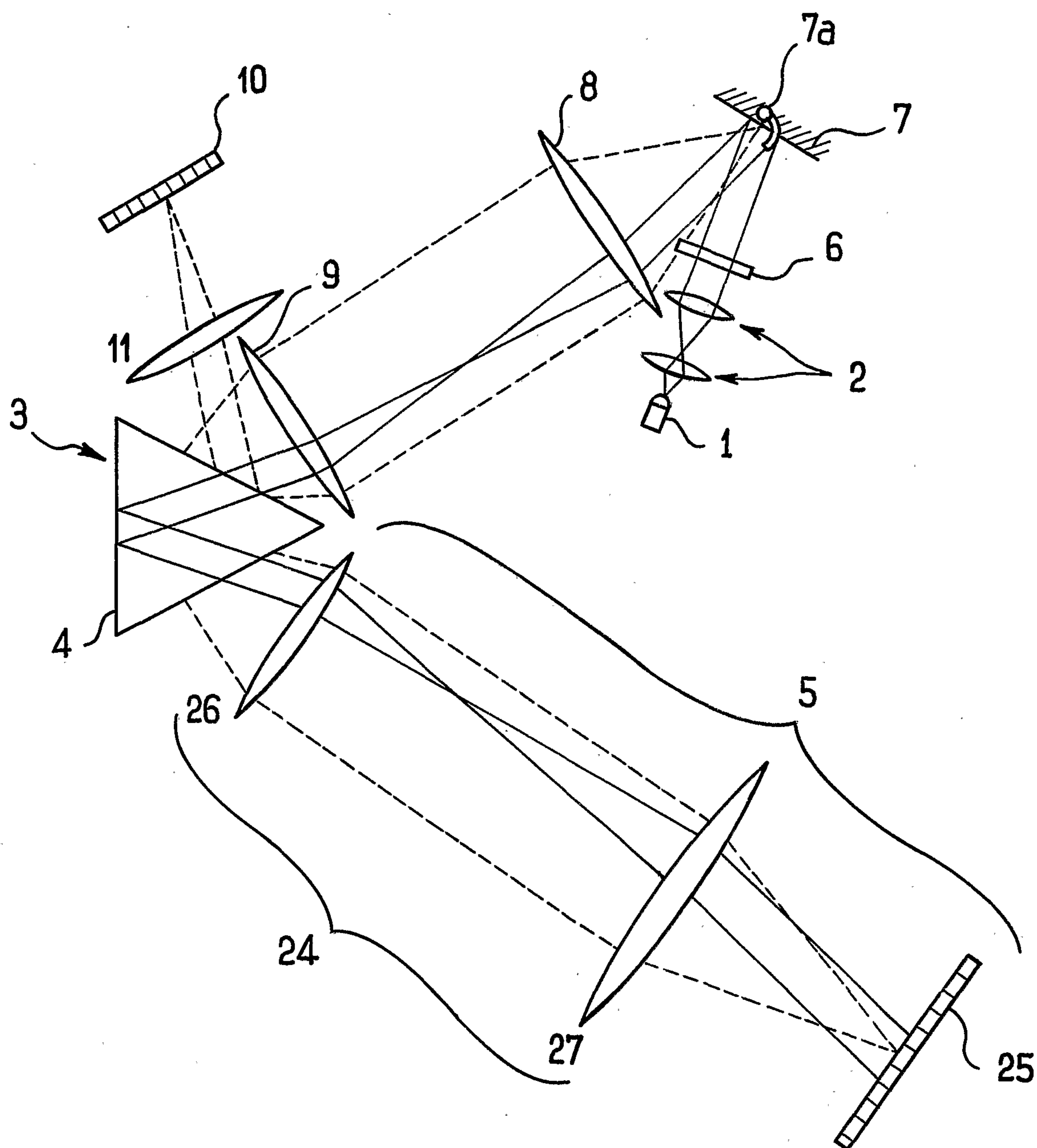
ledit système optique déflecteur comprend un miroir plan tournant apte à pivoter autour d'un axe parallèle à une arête du prisme.

13. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, dans lequel le dispositif de détection est apte à analyser la lumière de façon à mesurer et/ou
5 comparer la réflectivité de toute région ponctuelle de la partie utile.

14. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 7 à 13, dans lequel le dispositif de détection comprend une matrice CCD ou C-MOS.

15. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 7 à 14, dans lequel la couche mince métallique comporte, sur les zones actives, au moins une population de
10 ligands immobilisés.

1 / 2

FIG.1

2 / 2

FIG. 2