

(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
21 avril 2011 (21.04.2011)


PCT


(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/045360 A1

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 15/14 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2010/065382

(22) Date de dépôt international :
14 octobre 2010 (14.10.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0904966 16 octobre 2009 (16.10.2009) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES [FR/FR]; 25 rue Leblanc, Bâtiment "Le Ponant D", F-75015 Paris (FR).

(72) Inventeur; et
(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : **ALLIER, Cédric [FR/FR]; 16, rue René Thomas, F-38000 Grenoble (FR).**

(74) Mandataires : **BREDA, Jean-Marc et al.; Marks & Clerk France, Conseils en Propriété Industrielle, Immeuble Visium, 22 avenue Aristide Briand, F-94117 Arcueil Cedex (FR).**

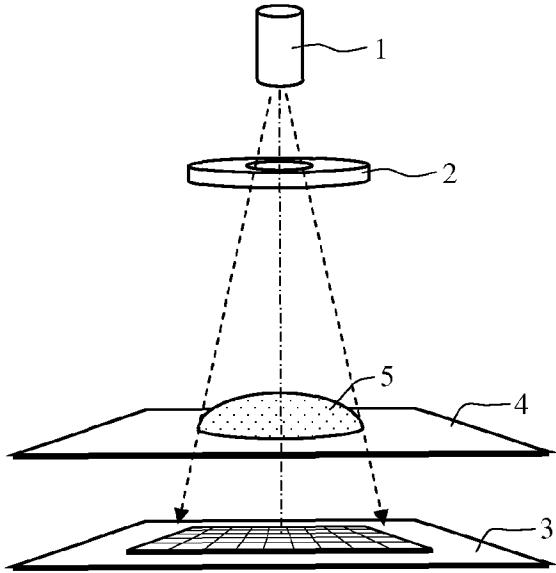
(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : METHOD FOR OPTICALLY DETECTING DISSOLVED MICROMETRIC OBJECTS

(54) Titre : PROCÉDÉ DE DÉTECTION OPTIQUE D'OBJETS MICROMÉTRIQUES EN SOLUTION



(57) Abstract : The general field of the invention is that of contact-imaging devices. The method relates to the optical detection of particles or organisms of micrometric or sub-micrometric size by means of such a contact-imaging device, said particles or organisms being immersed in a drop (G) of liquid, the detection being carried out by means of a matrix of photosensitive cells or photosites. The method comprises a detection step or series of detection steps carried out during the evaporation of the liquid drop. It may also comprise a detection step carried out after the liquid drop has evaporated. Under certain conditions, it enables the reconstruction of a three-dimensional distribution of the particles or organisms in the initial drop before evaporation.

(57) Abrégé : Le domaine général de l'invention est celui des dispositifs à imagerie de contact. Le procédé concerne la détection optique de particules ou d'organismes de taille micrométrique ou sub-micrométrique au moyen d'un tel dispositif à imagerie de contact, lesdites particules ou organismes étant immersés dans une goutte (G) de liquide, la détection étant réalisée au moyen d'une matrice de cellules photo-sensibles

[Suite sur la page suivante]

FIG. 1



SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, **Publiée :**
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

- *relative au droit du déposant de revendiquer la priorité
de la demande antérieure (règle 4.17.iii))*

ou photosites. Le procédé comporte une étape de détection ou une succession d'étapes de détection réalisées pendant l'évaporation de la goutte de liquide. Il peut également comporter une étape de détection réalisée après l'évaporation de la goutte de liquide. Il permet, dans certaines conditions, de reconstituer une répartition tridimensionnelle des particules ou des organismes dans la goutte initiale avant évaporation.

Procédé de détection optique d'objets micrométriques en solution

Le domaine de l'invention est celui des dispositifs et des procédés de détection en imagerie de contact pour le diagnostic et l'analyse biologique.

5 Dans le domaine de l'imagerie optique pour le diagnostic biologique, si l'on se restreint à la détection spécifique, hors imagerie de contact, deux types de méthodes sont principalement utilisées. Ce sont la « cytométrie en flux » et l'imagerie moléculaire de fluorescence.

10 La cytométrie en flux est une technique puissante qui permet de compter, de caractériser et de classer les différentes cellules qui coupent le faisceau lumineux d'un laser. En analysant les figures de diffraction, il est possible de déterminer les dimensions de la cellule. Des mesures de fluorescence permettent en outre de distinguer les différentes familles de bactéries. L'inconvénient de cette technique est qu'elle nécessite une 15 instrumentation coûteuse et complexe. Un autre inconvénient est un angle solide de balayage relativement faible, limitant le champ d'investigation.

20 L'imagerie moléculaire de fluorescence est une méthode largement utilisée en diagnostic biologique en raison de sa très grande efficacité. La sensibilité des mesures en fluorescence est celle des évènements discrets : à l'aide de marqueurs fluorescents, il est possible de 25 détecter en microscopie des molécules individuelles. Pour obtenir de bons résultats, il est nécessaire de parfaitement séparer l'énergie qui excite les molécules fluorescentes appelée énergie d'« excitation » de celle émise par celles-ci, appelée énergie d'« émission ». Si d'excellents filtres existent aujourd'hui, ceux-ci imposent un conditionnement des faisceaux lumineux, en particulier une faible ouverture des faisceaux. Par conséquent, les 25 systèmes optiques de mise en œuvre de cette méthode sont complexes et volumineux. L'imagerie de fluorescence nécessite également l'ajout préalable d'un fluorophore dans le milieu à analyser, ce qui rend le procédé invasif.

Aussi, on cherche à remplacer ces techniques complexes et coûteuses par des dispositifs d'imagerie de contact, ayant un champ d'observation étendu et non invasifs.

5 Ces techniques se développent de plus en plus car elles permettent de détecter des cellules, des bactéries ou plus généralement des particules de taille micrométrique sans avoir recours aux systèmes optiques évolués précédents. Un dispositif d'imagerie de contact est représenté schématiquement en figure 1. Ce dispositif comporte une source d'éclairage 10 1, pouvant être une source de petite dimension, par exemple une diode électroluminescente, un diaphragme 2 permettant de limiter l'ouverture de la source et un imageur ou capteur 3 qui peut être une matrice de photosites, matrice de type « CCD », signifiant « Charge-Coupled Device » ou « C-MOS », signifiant « Complementary Metal Oxide Semiconductor ». De tels 15 imageurs comportent généralement des microlentilles associées à chaque photosite. Le diaphragme 2 n'est pas indispensable, mais son utilisation est avantageuse. On vient insérer entre cette matrice 3 et la source de lumière 1, une lame transparente 4 de type lame de microscope portant l'objet de l'étude 5.

20 Cet objet est une solution comportant des particules micrométriques, ces particules pouvant être des particules biologiques telles des cellules ou des bactéries ou d'autres particules telles des micro-billes. La goutte analysée repose sur la lame transparente 4 et son ménisque est au contact du gaz ambiant, ce gaz pouvant être de l'air. La matrice 3 est reliée à 25 un système d'affichage et/ou de traitement d'images, non représenté sur la figure 1. La distance séparant la diode 1 de la lame porte-objet 4 est de préférence supérieure à 1 centimètre, et peut être, par exemple, de quelques cm, typiquement comprise entre 2 et 5 centimètres. La distance séparant l'objet de la surface du capteur est comprise entre 0,1 et 2 millimètres. Bien 30 qu'on parle d'imagerie de contact, l'objet de l'étude n'est pas situé au contact direct du capteur, mais à la distance précédemment indiquée. La lame est constituée d'un matériau transparent tel la Silice, le quartz, et son épaisseur varie entre quelques dizaines de micromètres et 1 millimètre. Ce dispositif très simple, sans optique de grossissement peut constituer, dans certains 35 cas, une alternative aux méthodes conventionnelles de comptage optique

telles que la cytométrie en flux, la microscopie optique haute résolution ou les techniques d'imagerie moléculaire de fluorescence.

Depuis quelques années, plusieurs équipes ont obtenu des résultats impressionnants en imagerie de contact. Ainsi, une équipe de 5 l'université américaine UCLA (University of California, Los Angeles) utilise l'imagerie de contact pour détecter et identifier des bactéries. Cette méthode est décrite dans la publication suivante « Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics » de Sungkyu Seo and al. parue dans «The Royal Society of chemistry» - Dec. 5, 2008 – 2009, 9, 777-787. Dans 10 les dispositifs décrits dans cette publication, les bactéries sont placées dans un liquide entre deux plaques, l'ensemble étant posé sur une matrice de photosites. Un éclairage monochromatique est filtré par un diaphragme de 100 microns de diamètre pour obtenir une bonne cohérence spatiale. On obtient ainsi au niveau de la matrice de photosites une figure de diffraction 15 pour chaque cellule immergée. Selon les auteurs, les figures de diffraction obtenues sont suffisamment résolues et distinctes d'une espèce à l'autre pour permettre un comptage spécifique des différentes bactéries.

La méthode proposée par l'équipe de l'université UCLA est élégante. Elle présente cependant un inconvénient. Elle nécessite l'utilisation 20 de capteurs CCD haute sensibilité nécessairement coûteux. Ainsi, les capteurs utilisés sont des capteurs CCD haute sensibilité de marque « Kodak » et de référence « Kodak Kai-10002 ».

Si l'on utilise des capteurs standards, tels des capteurs CMOS ou 25 des CCD à bas coût, il est encore possible d'observer des figures de diffraction pour différents particules micrométriques de 1 micromètre de diamètre telles que des billes de Silanol, des billes de Latex ou des bactéries de type Escherichia Coli. Par contre, l'efficacité de détection est très faible, au mieux de l'ordre du %. La figure 2 représente ainsi le signal S obtenu sur 30 un axe x du capteur passant par le centre d'une particule P. Le signal S représente ici le niveau de gris mesuré par différents pixels selon l'axe des ordonnées, les pixels constituant l'axe des abscisses: il s'agit d'un profil. On voit que le rapport signal sur bruit est très faible, à peine suffisant pour permettre la détection de la particule.

Le procédé selon l'invention ne présente pas ces inconvénients. Il permet, en effet, dans un dispositif à imagerie de contact, de détecter des particules de taille micrométrique sans avoir recours à des capteurs haute sensibilité. La caractéristique principale du procédé selon l'invention est de 5 réaliser la mesure ou les mesures pendant ou après la phase d'évaporation de la goutte de liquide dans laquelle se trouvent les particules micrométriques (bactéries, cellules, billes ...) à détecter. Ainsi, contrairement aux mesures de l'art antérieur, la goutte n'est pas disposée entre deux 10 plaques. De plus, la goutte doit être au contact d'un gaz, par exemple de l'air, afin que l'évaporation puisse avoir lieu. On a en effet constaté que la 15 détection était beaucoup efficace au cours ou à la suite de l'évaporation.

Plus précisément, l'invention a pour objet un procédé de détection optique de particules ou d'organismes de taille micrométrique ou sub- 15 micrométrique au moyen d'un dispositif à imagerie de contact, lesdites particules ou organismes étant immergés dans une goutte de liquide, la détection étant réalisée au moyen d'une matrice de cellules photo-sensibles ou photosites, caractérisé en ce que ledit procédé comporte au moins une première étape de détection réalisée pendant l'évaporation de la goutte de 20 liquide. La goutte peut être placée soit sur une lame, située au contact ou à une faible distance de l'imageur. La goutte peut également être placée directement au contact de l'imageur.

Avantageusement, ledit procédé comporte au moins une seconde étape de détection réalisée après l'évaporation de la goutte de liquide.

25 Avantageusement, la détection est réalisée en périphérie de la goutte, à l'interface séparant la goutte de sa partie évaporée.

Avantageusement, ledit procédé comporte une succession d'étapes de détection réalisées à intervalles de temps réguliers pendant et/ou après l'évaporation de la goutte, chaque étape de détection permettant 30 de mesurer la répartition de particules ou d'organismes se trouvant dans un plan donné, ledit plan étant à une distance de la matrice de photosites dépendant du temps d'évaporation, l'ensemble desdites répartitions de particules ou d'organismes obtenues permettant de reconstituer une répartition tridimensionnelle des particules ou des organismes dans la goutte 35 initiale avant évaporation.

Avantageusement, le liquide est de l'eau ou, dans lorsque les particules à détecter sont des bactéries, un tampon biologique, par exemple du « TRIS », abréviation de trishydroxyméthylaminométhane. Selon un mode de réalisation préféré, le liquide comporte un agent mouillant, par exemple le 5 TWEEN 20, abréviation de polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate.

Enfin, le support qui est soit une lame transparente ou la surface du capteur portant la goutte de liquide peut être fonctionnalisée. Il peut également être rendu hydrophile. Il peut également être refroidi en dessous de la température ambiante.

10

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre donnée à titre non limitatif et grâce aux figures annexées parmi lesquelles :

15

La figure 1 représente un dispositif en imagerie de contact ;
La figure 2 représente le signal de détection obtenu avec une matrice à photosites à faible sensibilité ;

La figure 3 représente le principe du procédé de détection selon l'invention ;

20

La figure 4 représente un signal de détection obtenu avec une matrice à photosites à faible sensibilité en utilisant le procédé selon l'invention ;

La figure 5 représente des étapes de détection successives mettant en œuvre le procédé selon l'invention ;

25

Les figures 6 représentent des représentations d'observations de bactéries dans une goutte de tampon salin, ainsi que dans un film résultant de l'évaporation de la goutte. Les profils (6a et 6d) représentent l'intensité détectée en fonction de la position le long d'un axe horizontal x ;

30

Les figures 7 représentent des représentations d'observations de bactéries dans une goutte de tampon salin, avant et après évaporation, la goutte étant déposée sur une lame hydrophile ou hydrophobe. Les courbes 7a et 7c représentent l'intensité détectée en fonction du temps, en un point situé niveau de la goutte ;

35

Les figures 8 représentent l'image d'une particule de polystyrène de diamètre 500 nm, ainsi qu'un profil horizontal selon un axe X de cette image.

Comme on l'a vu, l'utilisation d'un capteur de faible sensibilité ne permet pas d'obtenir des rapports signal sur bruit élevés. Le procédé selon 5 l'invention permet d'augmenter considérablement le rapport signal sur bruit et par conséquence l'efficacité de détection. Les systèmes de détection selon l'art antérieur détectent les micro-particules ou les micro-organismes au sein même d'une goutte de liquide. Or, tant que les particules sont immergées, elles sont difficilement discernables, sauf à utiliser un capteur à haute 10 sensibilité. Ainsi, la vue de gauche de la figure 3 représente, au temps T , l'image issue d'une vue partielle d'une goutte G comportant des particules P . Cette image est issue d'un capteur d'un dispositif à imagerie de contact tel que précédemment décrit. Les particules ne sont pas discernables si le capteur a une sensibilité trop faible.

15 Or, lorsque la goutte de liquide s'évapore, les particules, bactéries ou billes micrométriques apparaissent très clairement au niveau de l'interface air/liquide, et plus particulièrement lorsque la particule se trouve dans le ménisque de la goutte. Ainsi, la vue de droite de la figure 3 représente, au temps $T+\Delta T$, l'image d'une vue partielle de la goutte G précédente 20 partiellement évaporée. Les particules P apparaissent clairement dans la zone Z de la goutte qui s'est évaporée. La partie située dans le coin supérieur droit, désignée par la lettre L , correspond à la lame non initialement recouverte de la solution.

La figure 4 représente ainsi le profil du signal S obtenu sur un axe 25 x du capteur passant par le centre d'une particule P . On voit que le rapport signal sur bruit est maintenant suffisant pour permettre la détection de la particule. Le rapport signal sur bruit représenté est suffisant pour envisager une détection d'une grande partie des cellules immergées. Il est de l'ordre de quelques dizaines de %. Cette méthode est reproductible. Le procédé selon 30 l'invention est donc très simple à mettre en œuvre. Il consiste essentiellement à réaliser des mesures pendant l'évaporation de la goutte de liquide. Une mesure ou une étape de détection consiste essentiellement à enregistrer les signaux détectés par les photosites de l'imageur du dispositif en imagerie de contact et à analyser leur amplitude.

L'explication physique de cette augmentation de contraste des particules éclairées pendant l'évaporation est complexe. Comme il l'est montré dans la description qui suit des exemples expérimentaux, cette augmentation peut être attribuée à la formation d'un fin film résiduel 5 recouvrant la particule, ce film subsistant quelque temps après l'évaporation de la goutte. Selon les propriétés de mouillabilité du liquide constituant la goutte sur la lame supportant la goutte, ce film est éphémère et disparaît en quelques secondes, voire moins ou ce film est durable et subsiste plusieurs secondes, voire quelques dizaines de secondes ou minutes. Il semble que la 10 présence de ce film résiduel, recouvrant la particule, fasse office de microlentille et permette ainsi une détection des bactéries avec un rapport signal sur bruit étonnamment élevé. En effet, l'intensité du signal est maximum lorsque la particule se trouve au niveau de la ligne d'évaporation et triple que celui au niveau du ménisque de la goutte.

15 Dans certaines conditions, il est possible que lorsqu'une goutte s'évapore, elle diminue essentiellement de hauteur, l'évaporation se produisant du haut de la goutte vers le bas et non pas du bord de la goutte vers le centre. Cela se produit, par exemple, lorsque la lame est inclinée de quelques degrés. On peut mettre à profit cet effet pour reconstituer une 20 répartition tridimensionnelle des particules ou des organismes dans la goutte initiale avant évaporation. Il suffit pour cela de réaliser une succession d'étapes de détection réalisées à intervalles de temps réguliers pendant l'évaporation de la goutte. Chaque étape de détection permet de mesurer la répartition de particules ou d'organismes se trouvant dans un plan donné, 25 ledit plan étant à une distance de la matrice de photosites dépendant du temps d'évaporation, l'ensemble desdites répartitions de particules ou d'organismes obtenues permettant de reconstituer une répartition tridimensionnelle des particules ou des organismes dans la goutte initiale avant évaporation. La figure 5 illustre ce principe. Sur cette figure, on a 30 représenté à trois temps différents de l'évaporation d'une goutte comportant des particules, d'une part une vue tridimensionnelle d'une portion de la goutte et d'autre part l'image correspondante issue du détecteur matriciel du dispositif à imagerie de contact. Il est à noter que les vues tridimensionnelles ne sont pas représentatives des dimensions réelles des gouttes et de leur 35 répartition. Au temps T_0 , seules deux particules émergent de la goutte et

sont identifiables sur l'image issue du détecteur. Elles sont représentées par des cercles blancs. Au temps T1, après 30 secondes d'évaporation, un plus grand nombre de particules émergent et sont identifiables sur l'image issue du détecteur. Enfin, Au temps T2, après 45 secondes d'évaporation, 5 l'évaporation est pratiquement achevée, toutes les particules émergent et sont identifiables sur l'image issue du détecteur. Ainsi, à partir des différentes images successives prises aux instants T0, T1, T2, ..., il devient possible de connaître la répartition tridimensionnelle des particules au sein de la goutte.

10 Il est possible, si l'on souhaite maîtriser parfaitement le procédé, de contrôler l'évaporation au moyen de diodes infrarouges, ou de résistances chauffantes ou d'un souffle de gaz atteignant le ménisque de la goutte. Des moyens de chauffage peuvent également être intégrés dans le substrat. Il s'agit par exemple de lames de quartz sur lesquelles on dépose une couche 15 mince d'ITO (Indium Tin Oxyde : oxyde d'indium et de tungstène), ce dépôt pouvant alors former une résistance électrique. Pour donner des ordres de grandeur, selon la taille de la goutte, le liquide utilisé et les conditions expérimentales, le temps d'évaporation d'une goutte dure de quelques secondes à quelques dizaines de secondes, le volume de la goutte étant 20 compris entre 1 microlitre et 20 microlitre, voire au-delà.

Différents liquides comme le TRIS, abréviation de trishydroxyméthylaminométhane ou l'eau purifiée peuvent être utilisés. Le TRIS présente l'avantage d'être une solution saline permettant de préserver 25 les bactéries quelques jours. Il est donc couramment utilisé en tant que tampon biologique. Il est préférable que la lame qui porte la goutte ne soit pas trop hydrophobe, voire hydrophile, comme on le montrera ultérieurement. Le procédé fonctionne avec différents types de particules. On citera, à titre d'exemples, les billes de Silanol de 1 micromètre de diamètre, 30 les billes de Latex de 1 micromètre de diamètre et des bactéries. Des essais concluants ont été réalisés sur des bactéries de type Escherichia Coli ou Bacillus Subtilus. Il fonctionne dans une grande gamme de concentrations, d'une particule par goutte jusqu'à cent mille particules par goutte.

Il est bien entendu préférable que l'éclairage venant de la source 35 soit le plus homogène possible. Autrement dit, la surface du ménisque est

éclairée selon une intensité sensiblement égale en chaque point. Il est également préférable que l'éclairage ait une certaine cohérence spatiale, c'est-à-dire que le diaphragme disposé devant la source soit de petites dimensions. On peut, par exemple, utiliser un diaphragme de 100 5 micromètres de diamètre.

Le dispositif d'acquisition est simple et peu coûteux puisqu'il ne comprend qu'une carte électronique d'acquisition des images numériques venant des photosites d'un capteur de type « CCD » bas coût ou « CMOS » 10 pour caméra de type « webcam », une diode électroluminescente, un diaphragme et une lamelle de verre. Les pixels ou photosites du capteur peuvent avoir des dimensions moyennes, de l'ordre de deux à dix microns. Ces capteurs ont un prix bien plus faible que celui des capteurs haute 15 sensibilité où la taille des pixels n'excède pas deux microns. Il s'agit de capteurs CMOS ou de CCD à faible coût.

Il est possible, pour améliorer la détection, d'utiliser des lames de verres dites « fonctionnalisées » au moyen d'anticorps pour isoler les bactéries spécifiquement du milieu bactérien. On peut alors détecter et identifier les bactéries détectées, l'identification étant réalisée selon la 20 fonctionnalisation de la lame.

Des essais de détection ont été réalisés en utilisant un dispositif tel que présenté sur la figure 1. La source de lumière 1 est une diode électroluminescente de puissance 1.7 W émettant à une longueur d'onde 25 centrée autour de 555 nm (Modèle K1Luxeon III de la marque Luxeon, marque déposée). Elle est placée à une distance de 10 cm en dessus du substrat 4. Ce dernier est une lame de microscope, en verre, de surface 70 mm x 25 mm et d'épaisseur 0.15 mm. Le capteur 3 est un capteur CMOS comprenant 800 x 600 pixels, la dynamique étant de 8 bits. La dimension de 30 chaque pixel est de 3 µm x 3 µm. Ce capteur a été retiré d'une webcam (modèle Talkcam 200 de marque V gear). Afin de placer le substrat 4 au plus près du photodétecteur 3, la membrane plastique recouvrant ce détecteur a été retirée.

On dépose un échantillon, d'un volume d'environ 1 µl, d'un 35 échantillon liquide sur le substrat 4 face au capteur 3. On laisse alors la

goutte s'évaporer, durant une durée de quelques minutes. Dans l'expérience, la solution utilisée est un tampon salin 10 mM TRIS HCl de pH égal à 8. De préférence, on peut ajouter 0.1 % en volume de polysorbate 20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate), connu sous le nom commercial 5 TWEEN 20.

Les figures 6a, 6b et 6c montrent respectivement un profil horizontal PI, une image et une représentation en trois dimensions de ladite image obtenue lorsque l'échantillon est illuminé par un faisceau lumineux 10 rendu spatialement cohérent en plaçant un diaphragme, de diamètre 100 µm, entre la source de lumière et l'échantillon liquide. De cette façon, on cherche à observer une tâche de diffraction produite par la bactérie présente dans la goutte. Le volume de la goutte est de l'ordre du µl.

On observe alors une tâche de diffraction holographique, telle que 15 décrite dans le document de S. Su Seo "Lensless holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics", Lab Chip 9 (6), 777-87 (2009).

Les figures 6d, 6e et 6f montrent respectivement un profil horizontal PI, une image et une représentation en trois dimensions de la dite 20 image obtenue lorsque l'échantillon est illuminé par la même source, sans le diaphragme. Avant de réaliser ces images, on a attendu que la goutte s'évapore. Le substrat étant suffisamment hydrophile, lorsque la goutte s'évapore, il reste un film mouillant recouvrant le substrat et les bactéries 25 déposées sur ce dernier. Ce film subsiste d'autant plus longtemps que le substrat est hydrophile, et que la solution de l'échantillon est mouillante et présente une tension de surface faible : on parle alors de formation d'un film ultra-mouillant.

La configuration mise en œuvre durant l'essai est favorable, 30 puisqu'on utilise une lame hydrophile, dans le cas présent un verre ayant subi un lavage aux ultra-sons et un rinçage à l'éthanol et le tampon biologique précédemment décrit rendu mouillant par l'adjonction d'un agent mouillant (0,1 % de TWEEN). On constate que selon une telle configuration, comme cela est illustré dans les figures 7, le film ultra-mouillant formé suite à

l'évaporation de la goutte se maintient longtemps : quelques minutes, voire plusieurs heures.

Les figures 6d, 6e et 6f sont à comparer respectivement aux 5 figures 6a, 6b et 6c. On voit que le rapport signal sur bruit obtenu en réalisant une image de contact de la bactérie recouverte d'un film mouillant est augmenté d'un facteur 20 par rapport à une image de contact de la bactérie baignant dans la goutte. Cela permet une détection sans ambiguïté de cette bactérie.

10

La formation d'un film, résultant de l'évaporation de la solution, est un des points clef du procédé selon l'invention. Un tel film joue le rôle d'une ou plusieurs microlentilles formées au dessus de la bactérie. Cela explique qu'on puisse détecter cette dernière avec un rapport signal sur bruit aussi 15 élevé, de l'ordre de 45.

Dans ces exemples, le rapport signal sur bruit (SNR) est défini comme suit :

$$SNR = \frac{\max\{I\} - \mu}{\sigma}$$

20

avec :

- I = amplitude de chaque pixel de l'image ;
- μ = moyenne de l'amplitude des pixels dans une zone considérée comme représentative du bruit ;
- σ = écart type de l'amplitude des pixels dans une zone considérée comme représentative du bruit.

25

Lorsque la goutte s'évapore, on observe la formation d'un tel film à la surface de la bactérie. Selon la solution utilisée, et notamment ses propriétés de mouillabilité et de tension de surface, le film subsiste plus ou 30 moins longtemps. Pour estimer l'épaisseur de ce film, on réalise des essais en plaçant des billes de polymère de différents diamètres. On observe alors que, lorsque le diamètre excède $5\mu\text{m}$, le film se rompt systématiquement. Aussi, on considère que l'épaisseur de ce film est inférieure à quelques μm , voire $5\mu\text{m}$. La rupture du film formé à la surface du substrat se détecte

aisément en réalisant des images avec le dispositif précédemment décrit, et schématisé dans la figure 1.

On réalise deux essais en utilisant le tampon précédemment décrit
5 d'une part sur un substrat hydrophobe, d'autre part sur un substrat hydrophile, vis-à-vis de la solution tampon utilisée. Par hydrophobe et hydrophile, on entend que l'angle d'une goutte au contact de ce substrat est respectivement inférieur et supérieur à 90°, cette définition étant communément admise.

10

Les figures 7a et 7b illustrent les résultats obtenus lorsque le substrat est hydrophobe. La figure 7a montre l'évolution temporelle d'un profil horizontal de l'image de la bactérie représentée en figure 7b, le profil passant par le centre de l'image de la bactérie. Pour $t < 48s$ (figure 7b-1), la goutte s'évapore et aucun signal significatif n'est détecté. Entre $t = 48 s$ et $t = 49s$, l'évaporation de la goutte conduit à la formation éphémère d'un film recouvrant la bactérie (figure 7b-2). On observe bien une augmentation du signal, correspondant à l'effet de la formation de ce film sur la bactérie. Le substrat étant hydrophobe, le film disparaît rapidement, ce qui explique la décroissance rapide de l'intensité du signal observée pour $t > 48,5s$ (figure 7b-3).

Les figures 7c et 7d illustrent les résultats obtenus lorsque le substrat supportant la goutte est hydrophile. La figure 7c montre l'évolution temporelle d'un profil horizontal P de l'image de la bactérie représentée en figure 7d, le profil passant par le centre de l'image de la bactérie. Pour $t < 7 s$, la goutte s'évapore et aucun signal significatif n'est détecté (figure 7d-1). Le temps $t = 7s$ correspond à la bactérie n'est recouverte que du film fin (figure 7d-2). Le substrat étant hydrophile, le film subsiste longtemps à la surface du substrat et de la bactérie (figure 7d-3). Ainsi, on observe un signal d'intensité importante sur une durée bien plus importante que dans le cas précédent, la durée étant ici de quelques dizaines de secondes. Après évaporation complète de la goutte, le film disparaît et on ne détecte plus la bactérie.

35

Ces figures confirment que le procédé selon l'invention permet une détection d'une bactérie en solution au moment où la goutte contenant la bactérie s'évapore, et notamment lorsque l'interface goutte / milieu extérieur se trouve au niveau de la bactérie, c'est-à-dire au moment où la bactérie 5 n'est recouverte que d'un film fin. En fonction de la mouillabilité de la solution, la formation du film est soit éphémère (durée inférieure à 1 ou 2s), soit durable. Plus la solution est mouillante sur le substrat considéré, plus la formation du film est durable. Par durable, on entend quelques dizaines de secondes, voire quelques minutes ou plusieurs heures.

10

Ainsi, lorsqu'on souhaite obtenir un film durable, il est préférable d'ajouter un agent mouillant dans la solution. Un agent de ce type est par exemple le TWEEN 20 précédemment défini, dont la concentration (en volume) est de 0,1 %.

15

La solution choisie pour le tampon lors des essais était le Tris HCl PH = 8 dilué à 10mM dans de l'eau distillée, des résultats particulièrement satisfaisants ayant été obtenus pour ce type de tampon. Tris est l'abréviation de trishydroxyméthylaminométhane, ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol.

20

D'autres tampons peuvent être utilisés. Lorsqu'on souhaite identifier des bactéries, on préfèrera des tampons biologiques maintenant les bactéries vivantes. L'ajout d'un agent mouillant, tel le tween, s'avère généralement très utile et permet la formation d'un microfilm plus durable. La 25 concentration volumique d'un tel agent est par exemple de l'ordre de quelques centièmes de % à quelques %, préférentiellement quelques centièmes de % à quelques dixièmes de % Parmi les autres tampons utilisables, on peut citer le PBS (Phosphate Buffer Saline), ou, hors utilisation biologique, l'eau distillée.

30

Les exemples précédents ont décrit l'observation de bactéries. Mais l'invention peut s'appliquer à l'observation de particules ou d'objets biologiques de taille inférieure à celle des bactéries. La figure 8 représente une image (figure 8a) et un profil PI (figure 8b) de l'observation d'une bille de 35 polystyrène, recouverte d'un film ultra-mouillant formé conséutivement à

l'évaporation d'une goutte du même tampon salin que celui décrit dans les exemples précédents. Le diamètre de cette bille est de 500 nm. Le rapport signal sur bruit de la détection demeure élevé (de l'ordre de 20).

5 Par ailleurs, en refroidissant le support de la goutte en dessous de la température ambiante, l'évaporation de la goutte est ralentie, et le film résiduel est plus durable. Par exemple, lorsque la température ambiante est de 20°, le support peut être porté à une température comprise entre 5 à 10°.

10 On peut alors également utiliser un imageur refroidi, ce qui permet d'augmenter le rapport signal sur bruit du signal détecté.

Concernant les applications industrielles du procédé selon l'invention, on citera, à titre d'exemples non limitatifs :

- Le contrôle de la qualité de l'air, en terme de charge bactérienne et fongique, des milieux hospitaliers, pharmaceutiques ou agro-alimentaires ;
- La mesure ou l'aide au diagnostic pour les études précliniques qui portent sur les micro-organismes, la biologie cellulaire et les pathologies ;
- Des mesures de concentrations de particules biologiques réalisées sur des fluides corporels.

20 On citera également, à titre d'exemple, le diagnostic bactériologique des infections urinaires. L'examen bactériologique des urines permet d'affirmer l'infection urinaire quand il montre la présence d'une bactériurie monomicrobie (une seule espèce de bactérie) avec un nombre de colonies supérieur à 100 bactéries/ μ l, associée à une 25 leucocyturie (présence de globules blancs dans les urines) supérieur à 10 leucocytes/ μ l ou une pyurie.

De telles mesures peuvent être effectuées facilement avec le procédé selon l'invention.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection optique de particules ou d'organismes de taille micrométrique ou sub-micrométrique au moyen d'un dispositif à imagerie de contact, lesdites particules (P) ou organismes étant immergés dans une goutte (G) de liquide la détection étant réalisée au moyen d'une matrice (3) de cellules photo-sensibles ou photosites, caractérisé en ce que ledit procédé comporte au moins une première étape de détection réalisée pendant l'évaporation de la goutte de liquide.

- 10 2. Procédé de détection optique selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit procédé comporte au moins une seconde étape de détection réalisée après l'évaporation de la goutte de liquide.

- 15 3. Procédé de détection optique selon la revendication 1, caractérisé en ce que la détection est réalisée en périphérie de la goutte, à l'interface (Z) séparant la goutte de sa partie évaporée.

- 20 4. Procédé de détection optique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit procédé comporte une succession d'étapes de détection réalisées à intervalles de temps réguliers pendant l'évaporation de la goutte.

- 25 5. Procédé de détection optique selon la revendication 4, caractérisé en ce que chaque étape de détection permet de mesurer la répartition de particules ou d'organismes se trouvant dans un plan donné, ledit plan étant à une distance de la matrice de photosites dépendant du temps d'évaporation, l'ensemble desdites répartitions de particules ou d'organismes obtenues permettant de reconstituer une répartition tridimensionnelle des particules ou des organismes dans la goutte initiale avant évaporation.

6. Procédé de détection optique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le liquide est de l'eau ou un tampon biologique

5 7. Procédé de détection optique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le tampon biologique est du « Tris »,
abrégation de trishydroxyméthylaminométhane.

8 Procédé de détection optique selon l'une des revendications
10 précédentes, caractérisé en ce que le liquide est rendu mouillant par ajout
d'un agent mouillant.

9 Procédé de détection optique selon la revendication 8,
caractérisée en ce que la concentration volumique de l'agent mouillant dans
15 le liquide est comprise entre quelques centièmes de % et quelques %.

10. Procédé de détection optique selon l'une des revendications précédentes, la goutte reposant sur une lame transparente ou sur la surface du capteur

20 11. Procédé de détection optique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la lame portant la goutte de liquide est fonctionnalisée.

25 12. Procédé de détection optique selon les revendications 10 et 11, la goutte reposant sur un support refroidi par rapport à la température ambiante

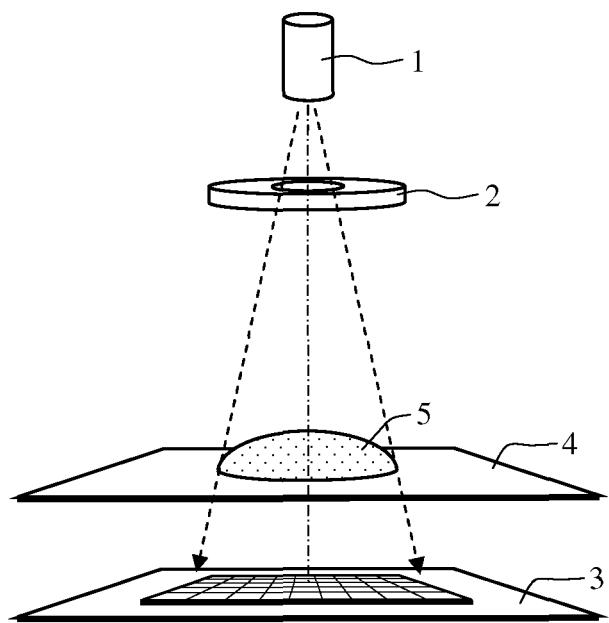


FIG. 1

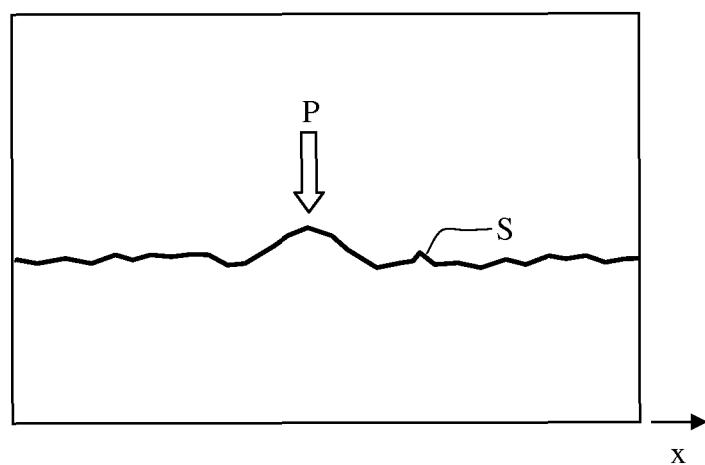


FIG. 2

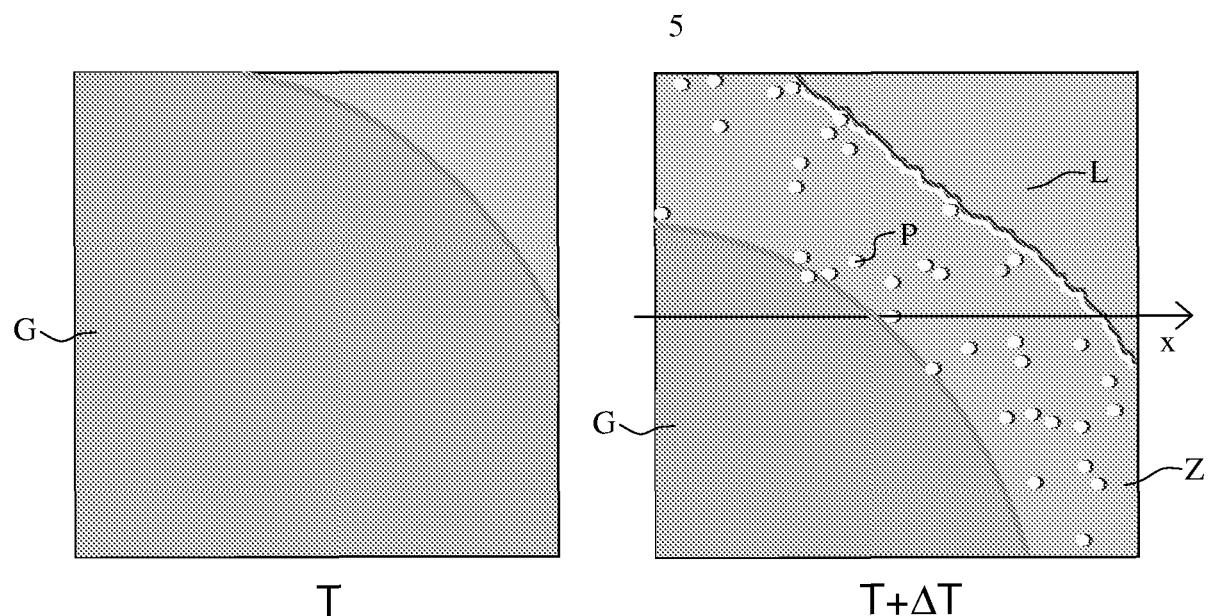


FIG. 3

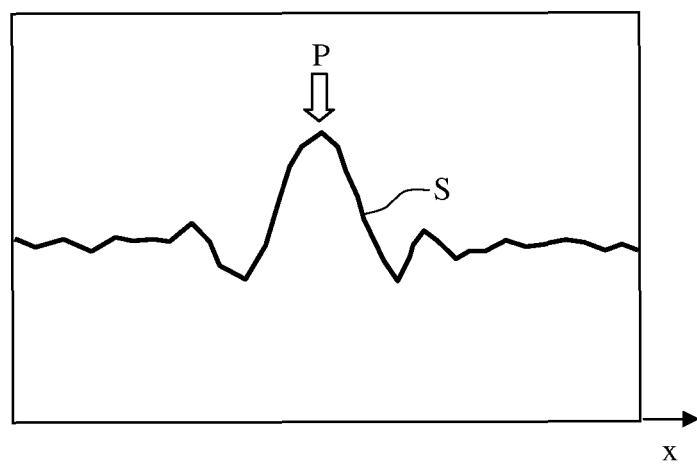


FIG. 4

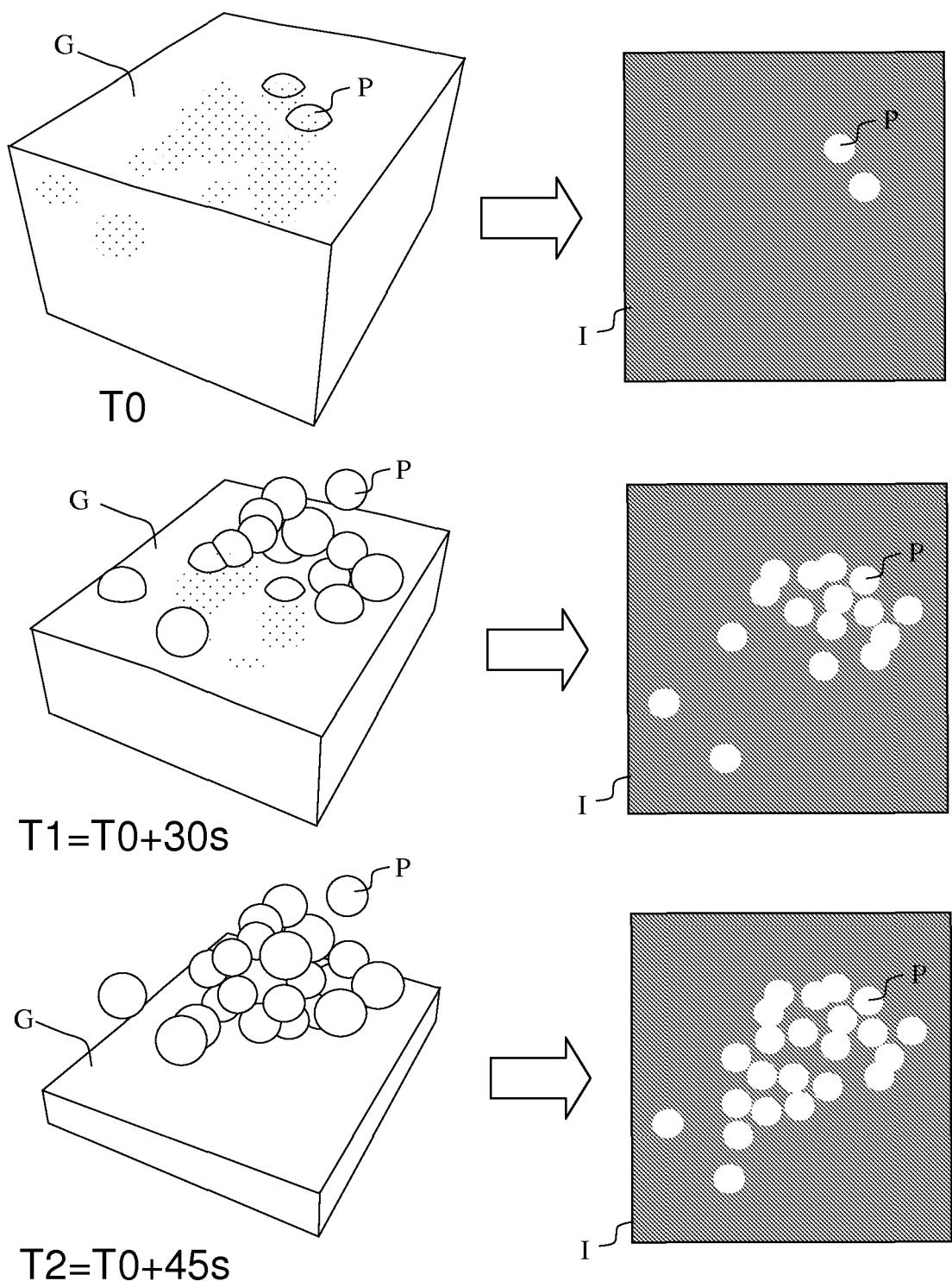


FIG. 5

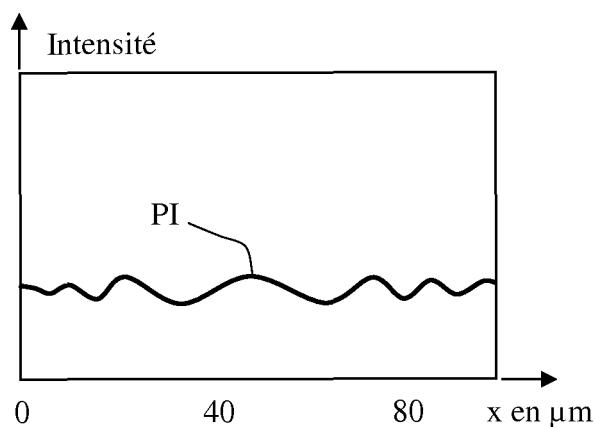


FIG. 6a

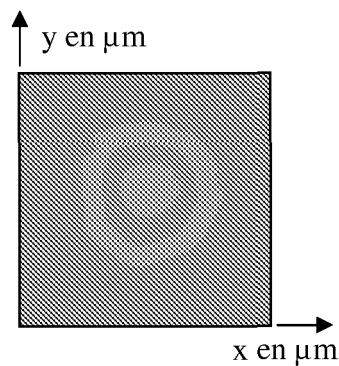


FIG. 6b

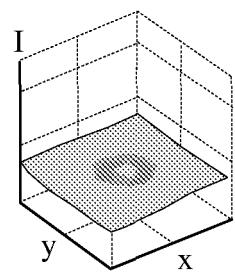


FIG. 6c

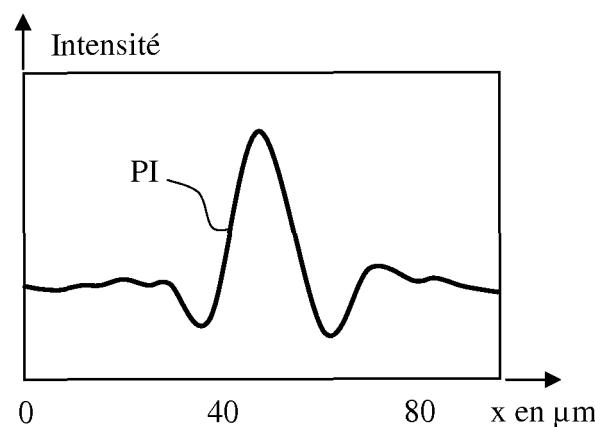


FIG. 6d

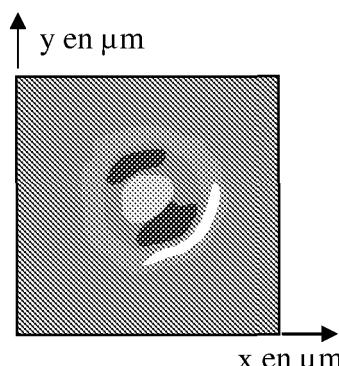


FIG. 6e

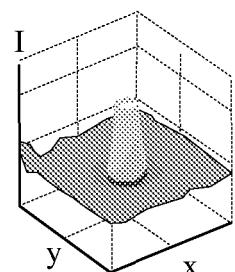


FIG. 6f

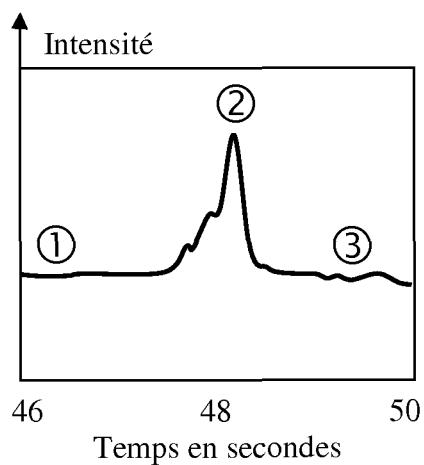


FIG. 7a

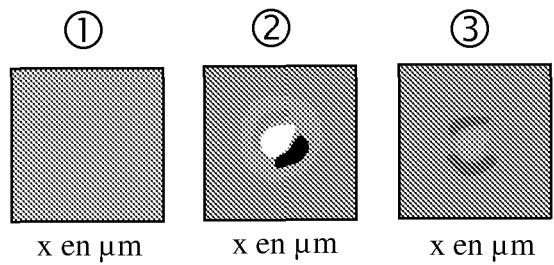


FIG. 7b

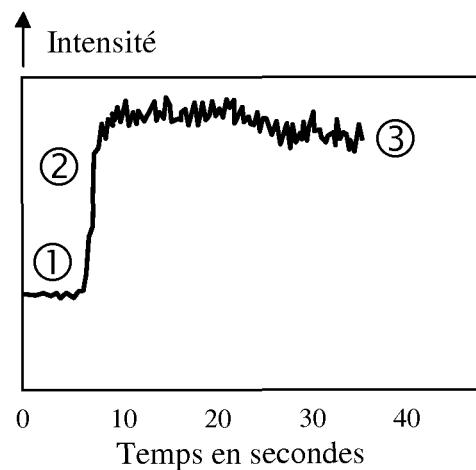


FIG. 7c

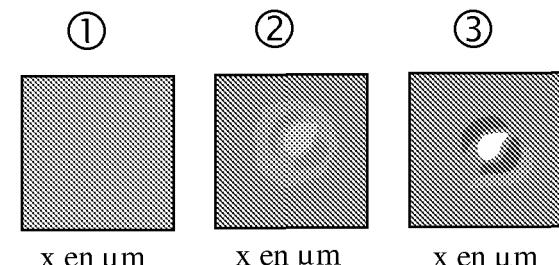


FIG. 7d

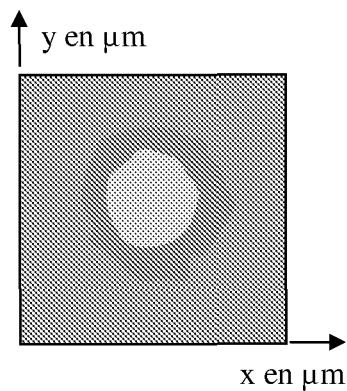


FIG. 8a

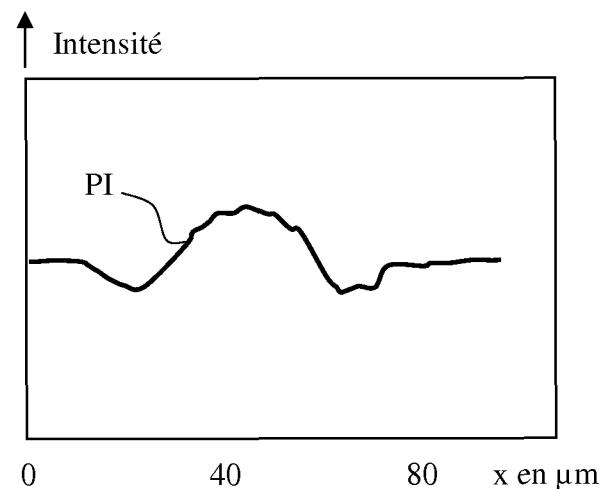


FIG. 8b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/065382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N15/14
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)
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 practical, 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.
X	JUNG-YEUL JUNG ET AL: "behaviour of particles in an evaporating didisperse colloid droplet on a hydrophilic surface", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 81, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 8256-8259, XP002582596, the whole document ----- WO 2007/131945 A2 (CARL STUART LTD [IE]; MCMILLAN NORMAN [IE]; SMITH STUART [IE]; O'NEILL) 22 November 2007 (2007-11-22) page 6, line 33 - page 9, line 16 page 16, line 6 - page 17, line 7 page 27, lines 17-34 ----- -/-	1-12
X		1

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 document 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 14 January 2011	Date of mailing of the international search report 26/01/2011
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 Cantalapiedra, Igor

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/065382

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TITTU THOMAS NELLIMOOTTIL ET AL: "evaporation-induced patterns from droplets containing motile and non-motile bacteria", LANGMUIR (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY), vol. 23, no. 17, 7 December 2007 (2007-12-07), pages 8655-8658, XP002582542, the whole document -----	1-12
A	SUNGKYUO SE ET AL: "Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostic", LAB CHIP (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY), vol. 9, 5 December 2008 (2008-12-05), pages 777-787, XP002582445, cited in the application the whole document -----	1-12
A	US 2007/273867 A1 (DIESSEL EDGAR [DE] ET AL) 29 November 2007 (2007-11-29) paragraphs [0067], [0 75] -----	1
A	FR 2 192 708 A5 (CTRE NAL TRANSF SION SAN [FR]) 8 February 1974 (1974-02-08) the whole document -----	1-12
A	US 2002/198928 A1 (BUKSHPAN SHMUEL [IL] ET AL) 26 December 2002 (2002-12-26) figures 1f, 4a, 4b -----	1-12
A	FR 2 887 983 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 5 January 2007 (2007-01-05) the whole document -----	1-12
A	TH. KLUPSCH ET AL: "the distribution of a macromolecular solute within an evaporating drop: an exact analytical solution", COLLOID AND SURFACES (ELSEVIER), vol. 231, 12 December 2003 (2003-12-12), pages 85-102, XP002582591, figure 6 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No:

PCT/EP2010/065382

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2007131945	A2	22-11-2007	EP US	2027452 A2 2010277742 A1	25-02-2009 04-11-2010	
US 2007273867	A1	29-11-2007	DE EP WO	10328998 A1 1642115 A1 2005001447 A1	20-01-2005 05-04-2006 06-01-2005	
FR 2192708	A5	08-02-1974		NONE		
US 2002198928	A1	26-12-2002		NONE		
FR 2887983	A1	05-01-2007		NONE		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°

PCT/EP2010/065382

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. GO1N15/14
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)
GO1N

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
X	JUNG-YEUL JUNG ET AL: "behaviour of particles in an evaporating didisperse colloid droplet on a hydrophilic surface", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 81, 1 octobre 2009 (2009-10-01), pages 8256-8259, XP002582596, le document en entier ----- WO 2007/131945 A2 (CARL STUART LTD [IE]; MCMILLAN NORMAN [IE]; SMITH STUART [IE]; O'NEILL) 22 novembre 2007 (2007-11-22) page 6, ligne 33 - page 9, ligne 16 page 16, ligne 6 - page 17, ligne 7 page 27, ligne 17-34 ----- -/-	1-12
X		1

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

14 janvier 2011

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/01/2011

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

Cantalapiedra, Igor

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2010/065382

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	TITTU THOMAS NELLIMOOTTIL ET AL: "evaporation-induced patterns from droplets containing motile and non-motile bacteria", LANGMUIR (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY), vol. 23, no. 17, 7 décembre 2007 (2007-12-07), pages 8655-8658, XP002582542, le document en entier -----	1-12
A	SUNGKYUO SE ET AL: "Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostic", LAB CHIP (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY), vol. 9, 5 décembre 2008 (2008-12-05), pages 777-787, XP002582445, cité dans la demande le document en entier -----	1-12
A	US 2007/273867 A1 (DIESSEL EDGAR [DE] ET AL) 29 novembre 2007 (2007-11-29) alinéas [0067], [0 75] -----	1
A	FR 2 192 708 A5 (CTRE NAL TRANSF SION SAN [FR]) 8 février 1974 (1974-02-08) le document en entier -----	1-12
A	US 2002/198928 A1 (BUKSHPAN SHMUEL [IL] ET AL) 26 décembre 2002 (2002-12-26) figures 1f, 4a, 4b -----	1-12
A	FR 2 887 983 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 5 janvier 2007 (2007-01-05) le document en entier -----	1-12
A	TH. KLUPSCH ET AL: "the distribution of a macromolecular solute within an evaporating drop: an exact analytical solution", COLLOID AND SURFACES (ELSEVIER), vol. 231, 12 décembre 2003 (2003-12-12), pages 85-102, XP002582591, figure 6 -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale n°

PCT/EP2010/065382

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 2007131945	A2	22-11-2007	EP 2027452 A2 US 2010277742 A1	25-02-2009 04-11-2010
US 2007273867	A1	29-11-2007	DE 10328998 A1 EP 1642115 A1 WO 2005001447 A1	20-01-2005 05-04-2006 06-01-2005
FR 2192708	A5	08-02-1974	AUCUN	
US 2002198928	A1	26-12-2002	AUCUN	
FR 2887983	A1	05-01-2007	AUCUN	