

19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11) N° de publication : 2 893 414
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

21) N° d'enregistrement national : 05 11670

51) Int Cl⁸ : G 01 N 15/14 (2006.01), G 01 N 33/49

12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 17.11.05.

30) Priorité :

43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 18.05.07 Bulletin 07/20.

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

60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71) Demandeur(s) : DAURENJOU PHILIPPE CLAUDE
LOUIS — FR.

72) Inventeur(s) : DAURENJOU PHILIPPE CLAUDE
LOUIS.

73) Titulaire(s) :

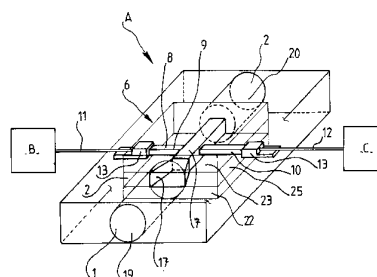
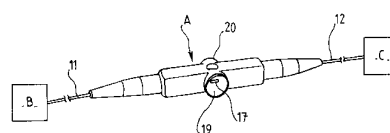
74) Mandataire(s) :

54) SYSTEME DE DIFFERENCIATION ET DE DENOMBREMENT DES PARTICULES SUSPENDUES DANS UN LIQUIDE.

57) L'invention concerne un système de différenciation et de dénombrement de particules suspendues dans un liquide, notamment des cellules contenues dans du sang.

Le système est caractérisé en ce qu'il comprend un composant optique (6) comportant, intégrés au composant, un canal d'écoulement (7) du liquide contenant les particules et un guide d'onde (8) qui est interrompu par le canal (7) et adapté pour véhiculer un signal optique et un dispositif d'émission (A) et de réception (B) du signal optique ayant traversé le canal.

L'invention est utilisable pour l'analyse du sang.



FR 2 893 414 - A1



L'invention concerne un système de différenciation et de dénombrement des particules suspendues dans un liquide notamment, mais non exclusivement, des cellules contenues dans le sang, telles que des lignées 5 érythrocytaires des lignées leucocytaires et des lignées thrombocytaires.

On connaît déjà des systèmes analyseurs de ce type, qui permettent des analyses qualitatives et quantitatives de ces lignées érythrocytaires, leucocytaires et 10 thrombocytaires du sang humain et animal. Ces analyseurs fonctionnent sur la base du principe de comptage de la "variation d'impédance" connue sous la dénomination "principe Coulter". Or, dans la mesure où cette exploration par variation d'impédance ne permet pas 15 d'obtenir des informations morphologiques sur les cellules, on associe fréquemment une lecture optique réalisée, soit par un banc optique à source lumineuse blanche, soit par un laser monochrome.

Par conséquent, les analyseurs connus présentent 20 une structure complexe et sont lourds et difficiles à manipuler. Ils nécessitent notamment un réglage fréquent des différentes parties constitutives.

L'invention a pour but de proposer un système analyseur qui permet de pallier ces inconvénients.

25 Pour atteindre ce but, le système de l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend un composant optique comportant, intégrés, un canal d'écoulement du liquide porteur des particules et un guide d'onde qui est interrompu par le canal et adapté pour véhiculer un 30 signal optique et un dispositif d'émission et de réception du signal optique ayant traversé le canal.

L'invention sera mieux comprise, et d'autres buts, caractéristiques, détails et avantages de celle-ci apparaîtront plus clairement au cours de la description 35 explicative qui va suivre faite en référence aux dessins schématiques annexés donnés uniquement à titre d'exemple

illustrant un mode de réalisation de l'invention et dans lesquels :

- la figure 1 est une vue en perspective du dispositif A comportant un composant à réseaux optique et microfluidique intégrés selon l'invention, complétée par une représentation schématique des dispositifs d'émission et de réception du signal optique ;

- la figure 2 est une vue schématique en perspective du dispositif A selon l'invention de la figure 1 ;

10 - la figure 3 est une vue en perspective du composant selon l'invention comportant, intégrés au composant des réseaux optiques et microfluidique, selon l'invention ;

- la figure 4 est une vue en coupe selon le plan IV-IV de la figure 3 ;

- la figure 5 est une vue en coupe, schématique, selon le plan V-V de la figure 4 ; et

20 - les figures 6A, 6B et 6C représentent respectivement le signal électrique représentatif du signal optique produit par le composant intégré selon l'invention et de ce signal après traitement.

L'invention est utilisable, de façon générale, pour la différenciation et le dénombrement de particules en suspension dans un liquide et notamment pour effectuer des analyses qualitatives et quantitatives des lignées érythrocytaire, leucocytaire et thrombocytaire du sang humain ou animal. L'invention propose ainsi un procédé et un appareil analyseur portable et autonome pour une application dans le diagnostic hématologique et, plus largement, dans le diagnostic médical. Des applications dans des domaines pharmaceutique et agro-alimentaire sont également envisageables.

30 A titre d'exemple, on décrira ci-après l'application de l'invention à la différenciation et au dénombrement des cellules en suspension dans du sang.

Les cellules sanguines, telles que des globules rouges, blancs et des plaquettes sont en suspension,

diluées dans du plasma, ce qui constitue le sang. Il est utile, pour déterminer certaines pathologies et évolutions de traitement, de connaître précisément les quantités et les morphologies des cellules sanguines.

5 A cette fin, il convient de sélectionner une à une les cellules et de les faire passer devant un système de mesure capable de les différencier, après avoir dilué en un premier temps le sang à analyser pour réduire la concentration de cellules dans le sang. Le sang dilué est
10 amené à s'écouler à travers un canal calibré à la taille des cellules qui est traversé par un faisceau de lumière. A chaque passage d'une cellule, la lumière incidente est modifiée et le signal récupéré renseignera sur la qualité des cellules et leur morphologie.

15 La figure 1 illustre le système analyseur permettant la mise en œuvre des étapes du procédé qui vient d'être énoncé. Cet analyseur comprend essentiellement un dispositif A de différenciation et de dénombrement de cellules sanguines en suspension dans le
20 sang entrant dans le dispositif par un orifice d'entrée 1 et sortant de celui-ci par un orifice de sortie 2 et des dispositifs émetteur B et récepteur C du signal lumineux de différenciation et de dénombrement.

En se référant à la figure 2, on constate que le
25 dispositif A comporte essentiellement un boîtier de forme générale parallélépipédique 4 et, à l'intérieur de ce boîtier, un composant optique 6 pourvu d'un réseau optique et d'un réseau microfluidique, qui sont intégrés au composant. Plus précisément, le composant 6, également
30 de forme parallélépipédique, est traversé par un microcanal 7 d'écoulement du sang à analyser, c'est-à-dire d'un canal calibré à la taille des cellules, qui s'étend perpendiculairement entre deux faces opposées du composant et un guide d'onde 8 qui s'étend entre les deux
35 autres faces opposées du composant, au milieu de ces faces, perpendiculairement au canal 6 en étant interrompu par celui-ci. Ainsi, le canal 7 divise le guide d'onde 8

en une portion de guide d'onde émetteur 9 et une portion de guide d'onde récepteur 10. Chaque portion de guide d'onde 9 et 10 présente une section transversale carrée et est couplée à une fibre optique à section transversale circulaire respectivement d'entrée 11 et de sortie 12 par l'intermédiaire d'une matrice à gorge en V respectivement 13, représentée schématiquement sur la figure 5. Cette dernière illustre également le couplage des guides d'onde de section carrée aux fibres optiques de section circulaire à l'aide de points de colle 15.

Comme on le voit sur la figure 2, mais encore plus clairement sur la figure 3, le canal microfluidique 7 présente une section transversale carrée qui s'élargit en direction de l'entrée à la manière d'un entonnoir 17 tout en conservant la même hauteur sur toute la longueur. Un tel profil en entonnoir, bien que non représenté, pourrait également être prévu du côté sortie du canal. Il est à noter que les deux portions de guide d'onde 9 et 10 présentent également une section carrée avantageusement de la même hauteur que le canal fluidique 7 ou légèrement inférieure.

L'ensemble formé par le composant optique 6 et les modules à gorge en V 13 est encapsulé dans le boîtier 4 qui assure donc la protection de cet ensemble. Le boîtier de protection 4 comporte un trou 19 débouchant dans la face extérieure avant et un trou 20 débouchant dans la face extérieure arrière du boîtier, qui sont tous les deux de section transversale circulaire et alignés avec le microcanal fluidique 7. Le sang à analyser entre dans le boîtier par le trou d'entrée 19, s'écoule le long du microcanal 7 et sort par le trou de sortie 20. Le boîtier est réalisé en toute matière appropriée, telle que de la résine ou toute autre matière polymérique.

Concernant le composant optique 6, il comprend en sandwich entre une couche de substrat inférieur 22 et une couche de revêtement 23, une couche 25 en un matériau photosensible hybride organo-minéral ou simplement

polymérique. Cette couche peut être de structure composite et composée d'un empilement d'une pluralité de couches élémentaires.

C'est dans cette couche 25 que le guide d'onde 8 avec ses portions émettrice 9 et réceptrice 10 est réalisé. Le matériau qui constitue cette couche présente la propriété de devenir insoluble après irradiation tandis que les parties non irradiées restent solubles, par exemple dans des solvants de type alcool et acétone. En tirant profit de cette propriété, le canal 7 est réalisé en disposant un masque sur la zone du futur canal 7 et en irradiant le restant de la couche qui est à découvert. Par conséquent, seulement la matière de la couche 25 en dessous du masque reste soluble et sera ensuite solubilisée par un solvant approprié.

Le guide d'onde 8 est réalisé dans la couche hybride 25 par dopage approprié de la matière devant constituer le guide d'onde de façon que la matière autour du guide d'onde présente un indice de propagation très élevé par rapport à celui du guide d'onde. La lumière préférant se déplacer dans un milieu à indice faible, reste à l'intérieur du guide et ne se propage pas à l'extérieur de celui-ci.

Grâce à l'intégration au composant 6 du guide d'onde et du canal, l'invention permet ainsi d'obtenir un alignement parfait entre le réseau optique et fluïdique lors de la fabrication du composant.

A titre d'exemple, le canal 7 à section carrée pourrait être de l'ordre de 80 micromètres x 80 micromètres, le guide d'onde pourrait être de l'ordre de 60 micromètres x 60 micromètres, le substrat pourrait avoir une épaisseur de l'ordre de 525 micromètres +/- 25 micromètres et le revêtement 23 une épaisseur d'environ 150 micromètres. Concernant le boîtier 4 contenant le composant optique 6, il pourrait avoir une longueur de 30 millimètres, une largeur de 10 millimètres et une hauteur

de 10 millimètres, la longueur du composant pourrait être de 6 à 10 millimètres.

Concernant le fonctionnement de l'invention, elle permet la détection de différents types de cellules, tels que des globules rouges, globules blancs et des plaquettes, du fait qu'elles se différencient les unes des autres par leur pouvoir d'absorption de la lumière qui est fonction de la longueur d'onde de la lumière utilisée. Pour différencier les cellules dans le sang que l'on fait passer à travers le canal 7 et ainsi à travers le faisceau de lumière véhiculé par le guide d'onde, on injecte dans celui-ci des composantes de lumière ayant des longueurs d'onde qui correspondent au pouvoir d'absorption maximal des différentes cellules sanguines. L'injection et la séparation des différentes composantes de lumière se fait du côté émetteur et du côté récepteur à l'aide de multiplexeurs-diviseurs de longueurs d'onde, connus sous la dénomination WDM. En comparant le rapport des faisceaux de lumière reçu et émis, révélant la quantité de lumière absorbée, on identifie la nature des cellules.

De façon générale, le passage d'une cellule à travers le faisceau de lumière véhiculé par le guide d'onde est détectable par une impulsion dans le signal lumineux reçu, comme on le voit sur la figure 6A qui représente le signal électrique reçu dans le dispositif de réception C après conversion du signal optique en un signal électrique. Sur la figure 6A, les différentes impulsions indiquent chacune le passage d'une cellule à travers le faisceau lumineux en raison du fait que cette cellule a absorbé une quantité prédéterminée de la lumière incidente. Il est à noter que la largeur de l'impulsion est un critère indiquant le volume de la cellule. Plus l'impulsion est large, plus le volume est important. La hauteur des impulsions fournit une autre information. En effet, en comparant les hauteurs des impulsions des différents composantes de lumière, il est

possible d'effectuer une classification de la cellule détectée à l'intérieur de la famille des populations à laquelle elle appartient.

Les figures 6B et 6C illustrent le signal électrique reçu après un traitement mathématique approprié. Il est à noter que le signal pourrait également être soumis à un traitement électronique impliquant des opérations de filtrage électrique.

Le système d'analyse qui vient d'être décrit présente de nombreux avantages par rapport aux analyseurs connus. Du fait de l'utilisation d'un composant ou d'une puce optique comportant un réseau optique et un réseau microfluidique, qui sont intégrés au composant dans un plan commun, résulte un alignement parfait et stable entre les guides d'onde d'entrée et de sortie de faisceau lumineux et le canal microfluidique. Le parfait alignement réalisé à la fabrication du composant optique exclut toute nécessité d'un réglage ultérieur et ne peut en aucun cas se dérégler, ce qui permet de réaliser le dispositif comportant le composant sous forme d'un instrument portable.

D'autre part, le composant d'optique intégré selon l'invention permet d'assurer une compatibilité avec le principe de lecture par impédancemétrie. Le module de lecture optique ne perturbe pas la lecture par impédancemétrie actuellement connue.

En utilisant un microprocesseur, il est possible d'effectuer jusqu'à dix images ou "clichés" ou plus de la cellule sanguine passante. L'invention permet donc d'obtenir un système d'analyse extrêmement précis qui est utilisable pour utiliser des cellules du vivant, relevant de la biologie végétale et animale, mais permet aussi d'étudier photométriquement des solutions spécifiques de multiples secteurs d'activité, notamment agro-alimentaire, pharmaceutique et chimique.

REVENDICATIONS

1. Système de différenciation et de dénombrement de
particules suspendues dans un liquide, notamment des
5 cellules contenues dans du sang, caractérisé en ce qu'il
comprend un composant optique (6) comportant, intégrés au
composant, un canal d'écoulement (7) du liquide contenant
les particules et un guide d'onde (8) qui est interrompu
par le canal (7) et adapté pour véhiculer un signal
10 optique et un dispositif d'émission (A) et de réception
(B) du signal optique ayant traversé le canal.

2. Système selon la revendication 1, caractérisé en
ce que le composant optique (6) comporte, en sandwich
entre une couche de substrat (22) et une couche de
15 revêtement (23) une couche (25) à l'intérieur de laquelle
sont réalisés le canal (7) et le guide d'onde (8).

3. Système selon la revendication 2, caractérisé en
ce que la couche (25) est en un matériau soluble qui
devient insoluble après irradiation et en ce que le canal
20 (7) est formé par irradiation de la couche à l'exception
de la partie devant former le canal (7), réalisé alors en
solubilisant la matière non irradiée.

4. Système selon l'une des revendications 2 ou 3,
caractérisé en ce que le guide d'onde (8) est réalisé
25 dans la couche (25) en conférant à la zone devant former
le guide d'onde un indice de propagation de lumière très
faible par rapport au matériau environnant.

5. Système selon l'une des revendications 2 à 4,
caractérisé en ce que la couche (25) est en un matériau
30 photosensible hybride organo-minéral ou polymérique.

6. Système selon l'une des revendications 1 à 5,
caractérisé en ce que le canal (7) présente une section
transversale carrée calibrée à la taille des particules à
analyser et présente la même hauteur que la couche (25).

35 7. Système selon l'une des revendications 1 à 6,
caractérisé en ce que le guide d'onde (8) présente une

section transversale carrée d'une hauteur égale ou légèrement inférieure à celle du canal (7).

8. Système selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'alignement entre le canal (7) et le guide d'onde (8) est obtenu lors de la fabrication du composant optique (6).

9. Système selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le composant optique (6) est encapsulé dans un boîtier de protection (4) comportant des trous d'entrée (19) et de sortie (20) du liquide, en alignement avec le canal (7).

10. Système selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le guide d'onde (8) à section transversale carrée est couplé à des fibres optiques à section circulaire émetteur et récepteur (11, 12), par l'intermédiaire de moyens coupleurs tels que des matrices à rainures en V (13).

11. Système selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens d'injection simultanés dans le guide d'onde (8) de composantes de lumière de différentes longueurs d'onde et de séparation de ces composants après passage à travers le canal (7).

12. Système selon la revendication 1, caractérisé en ce que, pour l'identification dans le liquide de particules de types différents se différenciant par un pouvoir d'absorption de lumière de longueurs d'onde différentes, on injecte dans le guide d'onde des composantes de lumière ayant les longueurs d'onde correspondant au pouvoir d'absorption des particules et identifie les particules d'après des quantités de lumière absorbées des différents composantes de lumière injectés.

13. Système selon la revendication 11, caractérisé en ce que le dispositif récepteur (C) comporte des moyens adaptés pour effectuer une classification des populations à l'intérieur d'un type de particules tels que des globules rouges, blancs ou plaquettes, par comparaison des hauteurs des impulsions des différentes composantes

de lumière, produites par le passage d'une particule à travers le faisceau lumineux véhiculé par le guide d'onde (8).

14. Système selon l'une des revendications 1 à 13,
5 caractérisé en ce que le dispositif de réception (C) comporte des moyens adaptés pour procurer une information sur le volume d'une particule en fonction de la largeur de l'impulsion produite lors du passage d'une particule à
10 d'onde (8), du signal reçu.

$\frac{1}{3}$

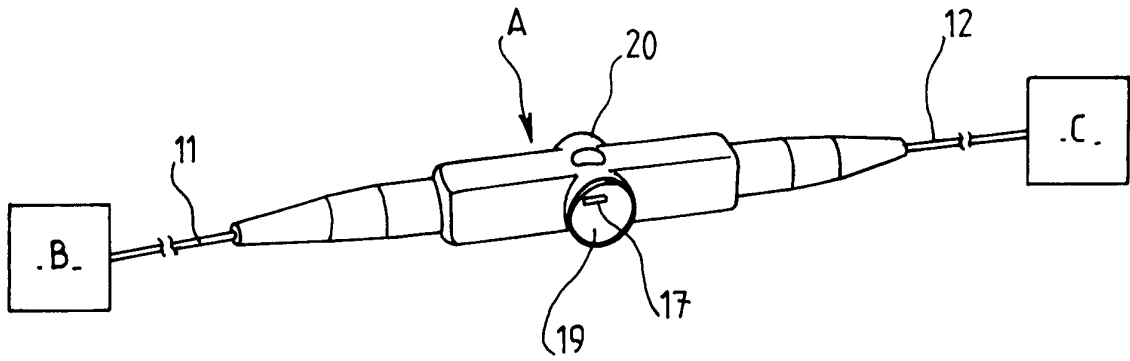


FIG. 1

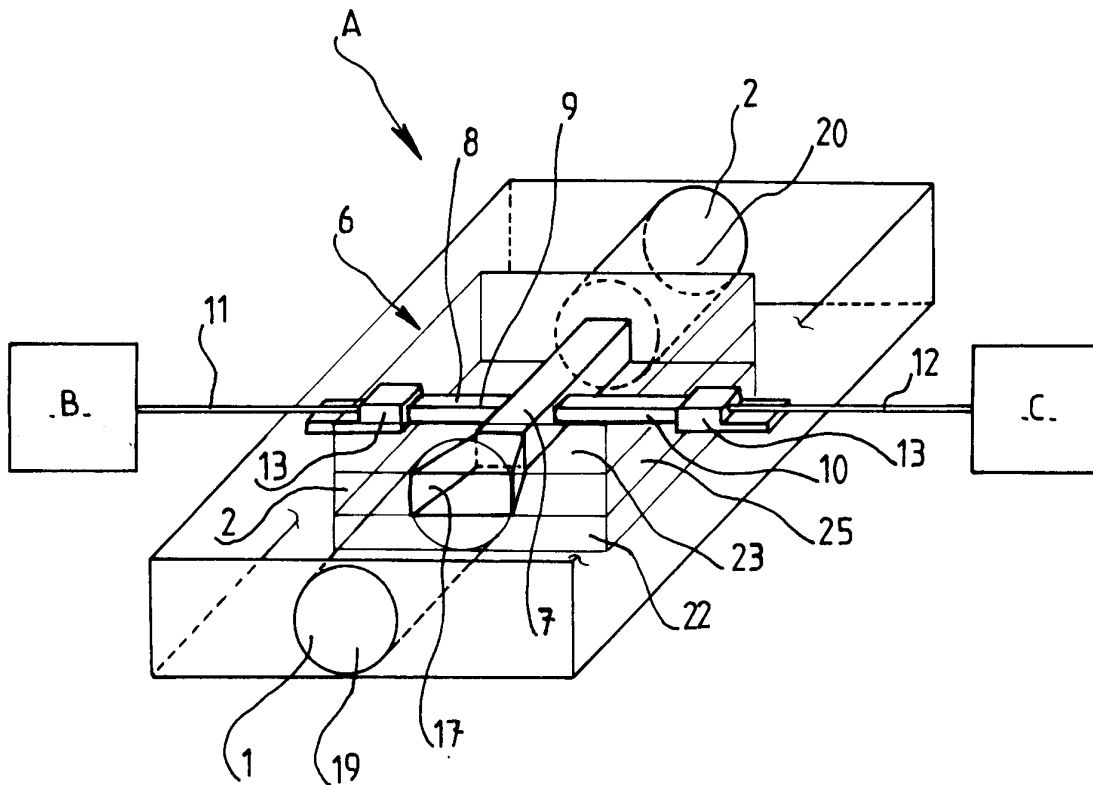


FIG. 2

2/3

FIG. 3

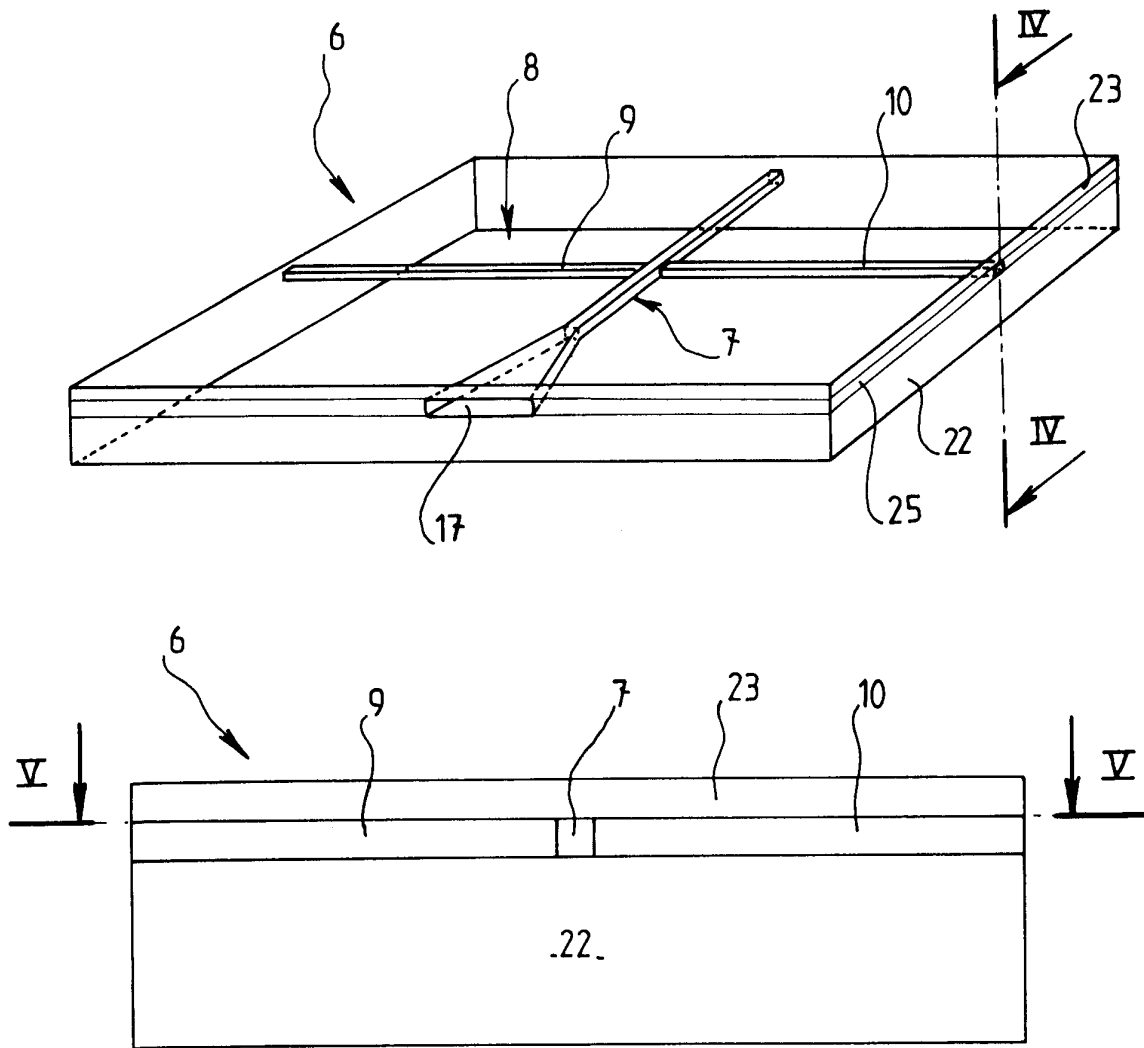


FIG. 4

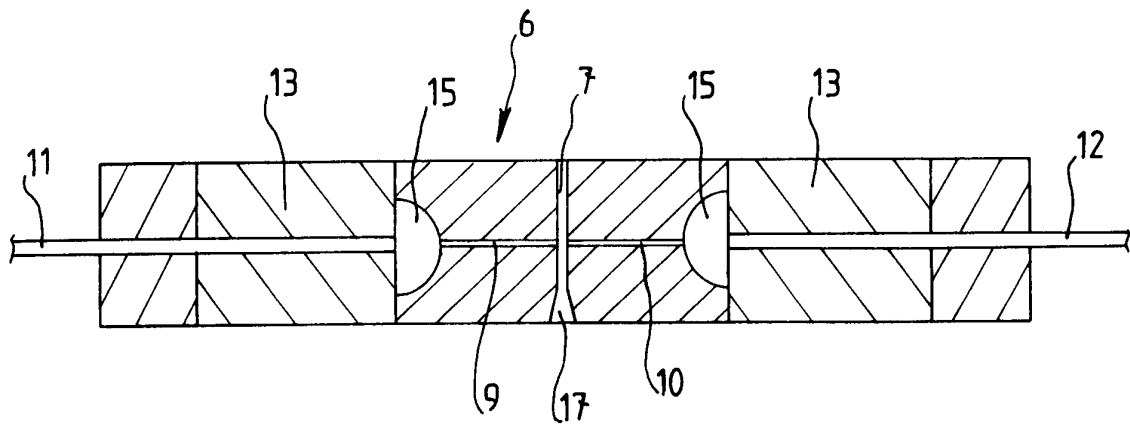


FIG. 5

3/3

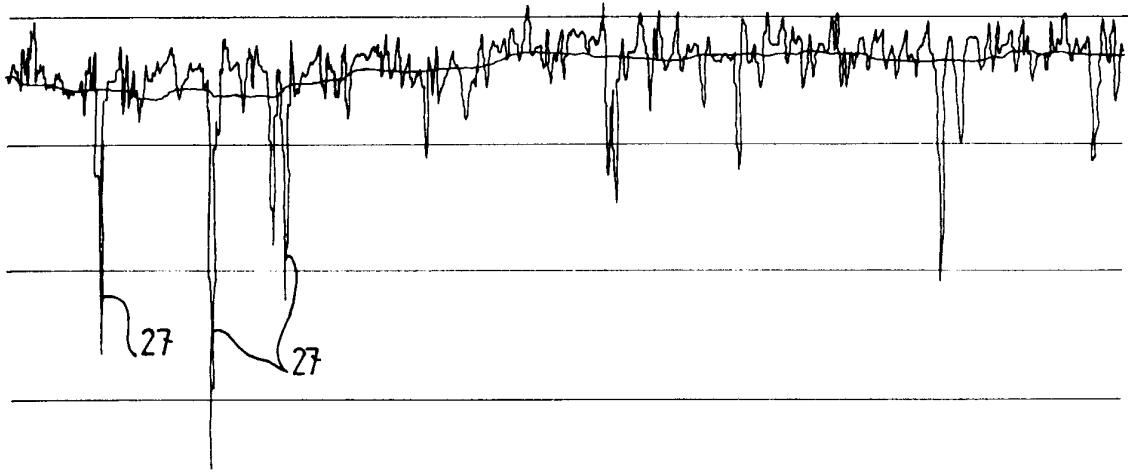


FIG. 6 A

FIG. 6 B

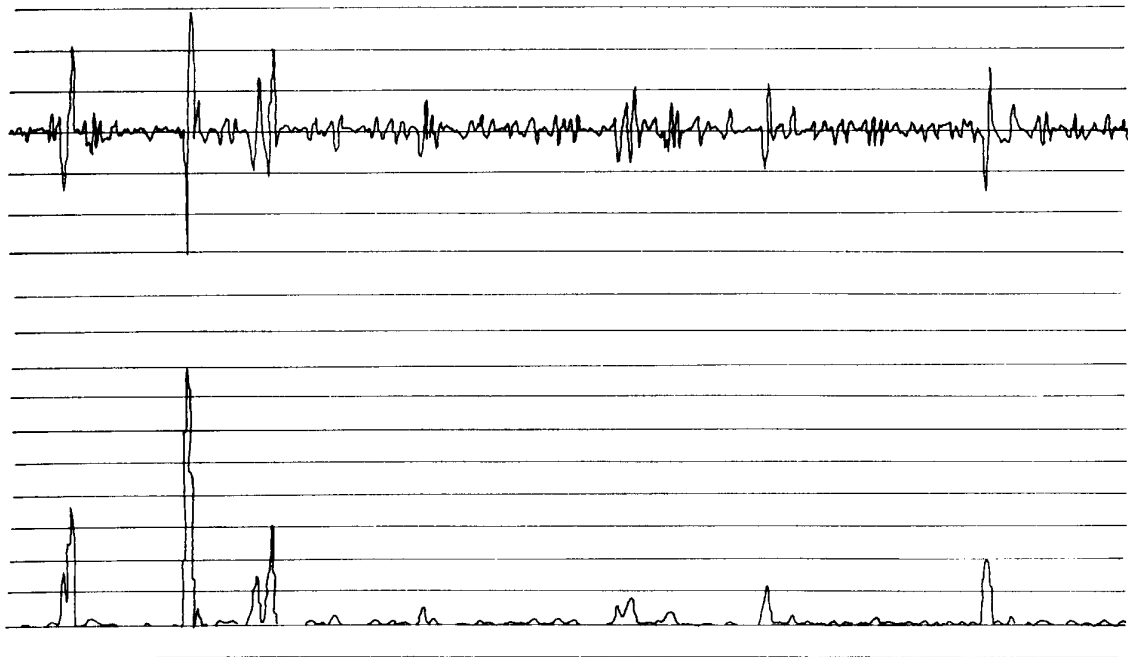


FIG. 6 C



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

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

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 675606
FR 0511670

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	SOBEK D ET AL: "A microfabricated flow chamber for optical measurements in fluids" PROCEEDINGS OF THE WORKSHOP ON MICRO ELECTRO MECHANICAL SYSTEMS (MEMS) FORT LAUDERDALE, FEB. 7 - 10, 1993, NEW YORK, IEEE, US, vol. WORKSHOP 6, 7 février 1993 (1993-02-07), pages 219-224, XP010111037 ISBN: 0-7803-0957-X	1,2,4,8,10	G01N15/14 G01N33/49
Y	* le document en entier * -----	3,5-7	
Y	LIN CHE-HSIN; LEE GWO-BIN; CHANG BAO-WEN; CHANG GUAN-LIANG: "A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photoresist" JOURNAL OF MICROMECHANICS AND MICROENGINEERING, vol. 12, 21 juin 2002 (2002-06-21), pages 590-597, XP002336579 INSTITUTE F PHYSICS PUBLISHING * abrégé * * page 590, colonne 2, ligne 1 - page 591, colonne 1, ligne 17 * * page 592, colonne 1, alinéa 2 - colonne 2, alinéa 3 * * figures 1,2 *	3,5	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) G01N B01L G02B G02F
Y	US 6 438 279 B1 (CRAIGHEAD HAROLD G ET AL) 20 août 2002 (2002-08-20) * abrégé * * colonne 2, ligne 5 - ligne 10 * * colonne 7, ligne 51 - ligne 67 * * colonne 9, ligne 3 - ligne 11 * * figures 1-5 *	6,7	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
24 mai 2006		Bravin, M	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0511670 FA 675606**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 24-05-2006

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6438279	B1	20-08-2002	AUCUN

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 675606
FR 0511670

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

1. revendications: 1-8,10

Structure d'un composant optique d'un analyseur de
particules

2. revendication: 9

boîtier de protection

3. revendications: 11-14

moyens d'injection et de réception d'un signal optique

La première invention a été recherchée.

La présente demande ne satisfait pas aux dispositions de l'article L.612-4 du CPI car elle concerne une pluralité d'inventions qui ne sont pas liées entre elles en formant un seul concept inventif général:

L'objet de la revendication indépendante 1 est déjà connu (cf. ci-dessous les motifs de cette objection). L'exigence d'unité de l'invention n'est donc pas observée, dans la mesure où il n'existe pas entre les objets des groupes suivants de revendications dépendantes de relation technique portant sur un ou plusieurs éléments techniques particuliers identiques ou correspondants: (2-8, 10), (9), (11-14).

Absence de nouveauté de la revendication 1:

Il est fait référence au document suivant:

D1: SOBEK D ET AL: "A microfabricated flow chamber for optical measurements in fluids" PROCEEDINGS OF THE WORKSHOP ON MICRO ELECTRO MECHANICAL SYSTEMS (MEMS) FORT LAUDERDALE, FEB. 7 - 10, 1993, NEW YORK, IEEE, US, vol. WORKSHOP 6, 7 février 1993 (1993-02-07), pages 219-224, XP010111037 ISBN: 0-7803-0957-X

Le document D1 décrit (les références entre parenthèses s'appliquent à ce document):

Un système de différenciation et de dénombrement de particules suspendues dans un liquide (cytomètre à flux, voir Abstract, D1), ledit système comprenant:

- un composant optique comportant, intégrés au composant, un canal d'écoulement du liquide comportant les particules et un guide d'onde qui est interrompu par le canal et adapté pour véhiculer un signal optique (cf. Figures 1, 2, D1), et
- un dispositif d'émission (laser He-Ne, Fig. 5, D1) et de réception

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 675606
FR 0511670

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

(Photodecteur 1, Fig. 5, D1) du signal optique ayant traversé le canal (cf. p. 224, col. 1, lignes 18-23, D1).

L'objet de la revendication 1 est donc connu de D1.

Remarque: la caractéristique "cellules contenues dans du sang", introduite par le terme "notamment", n'introduit aucune limitation de la revendication. Cette caractéristique est cependant également connue de D1 (cf. p. 223, col. 1, paragraphe 1 et Fig. 7, D1).