

12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 30.01.98.

30) Priorité :

43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 06.08.99 Bulletin 99/31.

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) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement public à caractère scientifique et technologique — FR.

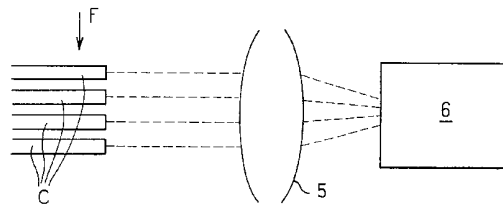
72) Inventeur(s) : SIEBERT RAINER, BOTTANI SAMUELE, REBSCHER HANS et VALENTIN LUC.

73) Titulaire(s) :

74) Mandataire(s) : REGIMBEAU.

54) PERFECTIONNEMENTS AUX SYSTEMES D'ELECTROPHORESE MULTICAPILLAIRE.

57) Système d'électrophorèse multicapillaire comportant une pluralité de capillaires juxtaposés, au moins une source pour l'émission d'un faisceau destiné à exciter des molécules se trouvant sur son trajet et à l'intérieur des capillaires, des moyens pour détecter la fluorescence des molécules excitées par ledit faisceau, caractérisé en ce que lesdits moyens sont agencés de façon à réaliser une détection de la lumière qui émerge en sortie desdits capillaires et qui se propage selon la direction dans laquelle lesdits capillaires s'étendent. La résolution des moyens de détection est suffisante pour distinguer la lumière qui émerge en sortie des capillaires de celle venant des parois de ceux-ci et/ou du milieu qui les entoure.



PERFECTIONNEMENTS AUX SYSTEMES D'ELECTROPHORESE
MULTICAPILLAIRES

La présente invention est relative aux systèmes d'électrophorèse
5 multicapillaires.

On sait que les techniques d'électrophorèse en gel classiques, dans
lesquelles on injecte différents échantillons sur une pluralité de pistes
définies dans un gel compris entre deux plaques, ne sont pas
satisfaisantes, étant donné d'une part qu'elles nécessitent un certain
10 nombre d'opérations manuelles et d'autre part qu'elles ne permettent pas
des vitesses de migration et donc des débits de traitement très importants.

Or les grands programmes de séquençage et de génotypage
nécessitent un débit très élevé de séparation et d'identification des
molécules d'ADN.

15 On connaît par ailleurs des techniques d'électrophorèse utilisant pour
la migration un capillaire rempli de gel ou d'une autre matrice de séparation
présentant l'avantage d'être particulièrement maniable, facile à charger et
de permettre un fonctionnement sensiblement automatique, avec des
vitesses de séparation plus élevées que dans l'électrophorèse en plaques
20 de gel grâce à un champ électrique applicable important.

Toutefois, l'utilisation d'un seul capillaire ne permet pas d'atteindre
les mêmes débits que ceux que permettent les techniques d'électrophorèse
en plaques qui possèdent de nombreuses pistes en parallèle, même si
néanmoins les champs électriques qui peuvent être appliqués à un
25 capillaire, et donc les vitesses de migration obtenues, sont importants.

C'est pourquoi il a également été proposé des systèmes dits
multicapillaires comportant une barrette de plusieurs capillaires juxtaposés.

Un système de ce type est par exemple présenté dans la publication:
" Analysis of Nucleic Acids by Capillary Electrophoresis. " – C. Heller – p.
30 236 à 254 - Editions Vieweg – 1997.

Dans la technique décrite dans cette publication, les capillaires sont
maintenus les uns par rapport aux autres dans une cuvette en verre dans
laquelle lesdits capillaires s'étendent. Les molécules qui traversent les

capillaires sont excitées par un rayonnement laser qui est envoyé, juste en sortie de la barrette, dans le plan de ladite barrette et perpendiculairement à la direction selon laquelle les capillaires s'étendent.

La fluorescence des molécules excitées par ce rayonnement est
5 détectée au moyen notamment d'une caméra CCD qui est orientée avec un axe perpendiculaire au plan de la barrette de capillaires.

Cependant, un tel système, oblige à prévoir des flux laminaires empêchant que les molécules en sortie des différents capillaires ne divergent de façon trop importante. Pour cela, la cuvette nécessite une
10 réalisation mécanique de haute précision dans du verre. En particulier, le dispositif devra permettre d'éviter toute bulle de gaz venant perturber le flux.

Comme on l'aura compris, une telle technique présente l'inconvénient majeur d'être très onéreuse.

En outre, elle ne permet pas à l'opérateur de manier aisément les
15 capillaires, qui doivent être pré-remplis au moment de la fabrication.

Et on constate dans la pratique que cette technique est difficilement utilisable autrement que par des spécialistes.

Il a également été proposé des systèmes d'électrophorèse multicapillaires dans lesquels le faisceau laser d'excitation des molécules
20 est envoyé sur celles-ci au travers des parois des capillaires, selon un axe dans le plan de la barrette, perpendiculaire à la direction selon laquelle les capillaires s'étendent, la fluorescence des molécules étant là aussi observées par des moyens de réception présentant un axe optique perpendiculaire au plan de la barrette des capillaires.

25 On pourra par exemple à cet égard se référer à la publication :

" A capillary Array Gel Electrophoresis System Using Multiple Laser Focusing for DNA Sequencing " – T. Anazawa, S. Takahashi, H. Kambara – Anal. Chem. – Vol. 68, N°15, - 1^{er} Août 1996 – p. 2699-2704.

Toutefois, une telle technique est peu satisfaisante compte tenu du
30 bruit de détection résultant de l'interaction de la lumière d'excitation et de la fluorescence des parois du capillaire. En outre, le faisceau laser perd en intensité au fur et à mesure qu'il traverse les capillaires, de sorte que les molécules qui se trouvent dans les capillaires les plus éloignés de la source

laser sont moins excitées que celles qui se déplacent dans les premiers capillaires.

Pour résoudre ce problème, il a également été proposé, notamment dans

- 5 "Capillary Array Electrophoresis Using Laser-Excited Confocal Fluorescence Detection"- X. Huang, M. Quesada, R. Mathies – Anal. Chem. 1992, 64, 967-972,

d'utiliser un faisceau d'excitation émis perpendiculairement par rapport au plan de la barrette et de réaliser une détection de la fluorescence par des
10 moyens optiques dont l'axe est confondu avec celui du faisceau, cet axe et le faisceau d'excitation étant déplacés successivement dans le temps de capillaire en capillaire.

Mais cette technique n'est pas non plus satisfaisante étant donné qu'elle nécessite des moyens mécaniques complexes et qu'en outre le
15 déplacement des moyens de détection d'un capillaire à un autre induit beaucoup de temps mort.

Un but de l'invention est donc de proposer un système d'électrophorèse multicapillaires qui ne présente pas les inconvénients des techniques antérieures et qui est particulièrement fiable, facile d'utilisation,
20 et présente des performances permettant un séquençage et un génotypage à haut débit.

Plus particulièrement, l'invention propose un système d'électrophorèse multicapillaire comportant une pluralité de capillaires juxtaposés, au moins une source pour l'émission d'un faisceau destiné à
25 exciter des molécules se trouvant sur son trajet et à l'intérieur des capillaires, des moyens pour détecter la fluorescence des molécules excitées par ledit faisceau, caractérisé en ce que lesdits moyens sont agencés de façon à réaliser une détection de la lumière qui émerge en sortie desdits capillaires et qui se propage selon la direction dans laquelle
30 lesdits capillaires s'étendent.

Ce système est avantageusement complété par les différentes caractéristiques avantageuses suivantes prises seules ou selon toutes leurs combinaisons techniquement possibles :

- la résolution des moyens de détection est suffisante pour distinguer la lumière qui émerge en sortie des capillaires de celle venant des parois de ceux-ci et/ou du milieu qui les entoure ;
- un cache noir formant diaphragme est monté en sortie des capillaires ;
- 5 - le système comporte une matrice de capillaires ;
- le faisceau d'excitation est de section droite elliptique et attaque simultanément plusieurs capillaires superposés ;
- l'espace entre les capillaires est rempli, au moins sur la trajectoire du faisceau d'excitation, par un matériau dont l'indice de réfraction est
- 10 choisi pour que le faisceau d'excitation ne diverge pas après avoir traversé un capillaire ;
- ledit matériau est transparent et non fluorescent ;
- le système comporte des moyens pour appliquer dans la cuvette de détection, une pression qui permet de remplir les capillaires avec la
- 15 matrice de séparation ;
- le système comporte au moins un prisme intermédiaire pour séparer spatialement les différentes longueurs d'onde de fluorescence.
- il comporte des guides optiques qui sont alignés avec les capillaires et récupèrent la lumière directionnelle en sortie de ceux-ci pour la guider
- 20 sur des capteurs photosensibles.
- il comporte en outre des moyens de multiplexage, qui, en combinaison avec lesdits capteurs photosensibles, permettent une détection de différentes longueurs d'onde.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront

25 encore de la description. Cette description est purement illustrative et non limitative. Elle doit être lue en regard des dessins annexés sur lesquels :

- la figure 1 est une représentation schématique en perspective d'un système conforme à un mode de réalisation possible de l'invention ;
- 30 - la figure 2 est une représentation schématique en illustrant la disposition des moyens de détection par rapport aux capillaires pour le système de la figure 1 ;

- les figures 3a et 3b illustrent l'utilisation d'un faisceau d'excitation de section droite circulaire ;
- les figures 4a et 4b illustrent l'utilisation d'un faisceau de section droite elliptique ;
- 5 - la figure 5 illustre l'utilisation d'une matrice de capillaires ;
- les figures 6a et 6b illustrent deux variantes possibles pour le montage des capillaires ;
- les figures 7a et 7b sont deux photographies illustrant la répartition du faisceau d'excitation après avoir traversé des
- 10 capillaires, selon l'indice du milieu qui environne les capillaires et qui est traversé par ledit faisceau d'excitation ;
- la figure 8 est un graphe sur lequel on a porté la réponse du système en fonction de la concentration des oligonucléotides ;
- la figure 9 est un graphe sur lequel on a porté le rapport
- 15 signal/bruit en fonction de la puissance totale du laser d'émission ;
- la figure 10 est un graphe sur lequel on a porté l'intensité collectée en fonction du temps pour un exemple de séparation d'échantillons mis en œuvre avec le système illustré sur la figure
- 20 1 ;
- la figure 11 est un graphe sur lequel on a porté l'intensité du signal collecté en fonction de l'ouverture de l'objectif ;
- la figure 12 est une représentation schématique en vue de dessus illustrant des moyens possibles pour la détection de différentes
- 25 longueurs d'ondes de fluorescence des différentes molécules.

Le système d'électrophorèse multicapillaire représenté sur la figure 1 comporte, sur une table optique 1 :

- un canal 3 dans lequel s'étendent des capillaires,
- une boîte à haute tension 2 sur laquelle sont montées les entrées des
- 30 capillaires,
- une cellule de détection 4 disposée en sortie du canal 3,
- une caméra CCD 6 et une optique de convergence 5 interposées entre ladite caméra 6 et la cellule de détection,

- une source laser 7,
- des moyens optiques 8 qui sont montés sur un rail 9 et qui permettent de diriger le faisceau de la source 7 sur la cellule de détection 4.

Ainsi que l'illustre plus particulièrement la figure 2, la caméra CCD 6 observe la fluorescence des molécules excitées par le faisceau F laser selon un axe optique qui est parallèle à l'axe des capillaires C.

Dés lors que la résolution de la caméra est suffisante, ceci permet de distinguer la lumière qui émerge de l'intérieur des capillaires C de celle venant des parois de ceux-ci et/ou du milieu qui les entoure. Il en résulte une amélioration considérable du rapport signal sur bruit.

Par exemple, dans le cas de capillaires C de 100 μm de diamètre intérieur et de 300 μm de diamètre externe, on peut utiliser comme détecteur une caméra CCD 6 permettant, en combinaison avec les moyens optiques 5, une résolution de l'ordre de 20-40 μm .

Egalement, pour minimiser le bruit de fond venant de la diffusion du faisceau F laser ou de la fluorescence des parois des capillaires C ou du milieu environnant, un cache noir formant diaphragme est avantageusement monté en sortie des capillaires C.

On notera qu'étant donné que l'observation de la fluorescence des molécules se fait en sortie des capillaires C selon un axe parallèle à la direction des capillaires C, il devient possible d'utiliser des matrices de capillaires C, ce qui permet de multiplier considérablement le rendement d'électrophorèse. Le terme matrice doit être entendu de façon générale et désigne tout ensemble de capillaires C dans lequel ceux-ci sont répartis en étant superposés les uns aux autres selon deux directions. Ce terme englobe par conséquent tout aussi bien des matrices constituées de plusieurs barrettes superposées que d'autres dispositions de capillaires et notamment par exemple des ensembles dans lesquels les capillaires sont répartis en quinconce

Le faisceau F d'excitation émis par la source laser 7 est envoyé sur la cellule de détection 4, pour attaquer les capillaires C perpendiculairement à la direction selon laquelle ils s'étendent.

Le faisceau F d'excitation peut alors être soit de section circulaire (figures 3a et 3b), auquel cas il est envoyé dans le plan d'une barrette de capillaires C pour traverser successivement ces derniers.

5 Avantageusement également, il peut être elliptique et attaquer une barrette selon une direction optique perpendiculaire au plan de ladite barrette, ce qui permet à un même faisceau F d'attaquer simultanément les différents capillaires C superposés (figures 4a et 4b). En outre, cela permet une plus grande tolérance sur la position relative des capillaires.

Et ainsi que l'illustre la figure 5, on utilisera avantageusement un 10 faisceau F elliptique dans le cas où les capillaires C sont répartis non pas selon une barrette, mais selon une matrice.

Les capillaires C peuvent être maintenus entre eux par collage et/ou par des pré-formes.

15 Par ailleurs, ainsi que l'illustre la figure 6a, il peut être prévu sur la trajectoire du faisceau d'excitation, dans les interstices entre les capillaires C un matériau dont l'indice de réfraction est choisi pour que le faisceau d'excitation ne diverge pas après avoir été traversé par un capillaire, notamment un matériau dont l'indice est inférieur à celui des capillaires.

Ce matériau est choisi aussi transparent que possible et non 20 fluorescent.

L'effet de focalisation obtenu avec un tel matériau est illustré par les photographies reprises sur les figures 7a et 7b. On voit sur ces photographies qu'un faisceau F éclairant plusieurs capillaires C en parallèle crée des zones d'ombres après le passage à travers les capillaires C quand 25 les indices des capillaires C et du milieu environnant sont proches, mais focalise la lumière transmise lorsque l'indice extérieur est inférieur à celui des capillaires C.

Cette focalisation permet par exemple d'utiliser un même faisceau F elliptique pour éclairer l'ensemble des capillaires C d'une même matrice.

30 Le matériau qui assure la fonction de focalisation peut éventuellement être constitué par le matériau qui sert à la fixation des capillaires. Toutefois, on préfère les solutions dans lesquelles on utilise, pour empêcher la divergence du faisceau d'excitation qui traverse les

capillaires, un matériau différent de celui qui assure la fixation des capillaires.

On notera d'ailleurs, ainsi que l'illustre la figure 6b, que dans ce cas, le matériau qui empêche la divergence du faisceau d'excitation peut être
5 constitué par la solution tampon dans laquelle les capillaires baignent.

On donne ci-après des détails techniques relatifs au montage qui est illustré sur la figure 1 qui a été utilisé par les inventeurs.

L'électrode dans la boîte 2 est alimentée dans un générateur de tension de type SPELLMAN.

10 Les entrées et sorties des capillaires C sont électriquement reliées par l'intermédiaire d'un tampon d'une solution de polymère à la cathode et à l'anode de ce générateur.

L'anode se trouvant à la masse, la tension appliquée sur la cathode peut aller jusqu'à 30 kV pour une longueur de capillaires C entre 25 et 60cm.

15 La cellule de détection 4 où débouchent les capillaires C est un parallélépipède rectangle aux parois opaques muni de deux fenêtres latérales en quartz pour l'entrée et la sortie du faisceau F laser, tandis qu'une autre fenêtre, également en quartz, se trouve dans l'axe des capillaires C pour permettre la collection de la lumière de fluorescence par
20 l'optique 5 et la caméra 6.

Cette dernière fenêtre peut être remplacée par un filtre pour discriminer la lumière de fluorescence de la lumière laser. En variante, ce filtre peut être disposé en sortie de ladite fenêtre.

Une quatrième fenêtre, sur la paroi supérieure de la cellule permet
25 d'observer avec un microscope l'alignement du faisceau F laser par rapport aux capillaires C.

La colle qui est utilisée pour fixer les capillaires C dans la cellule de détection est une colle transparente qui polymérise aux UV.

L'optique 5 est un objectif qui présente une focale de 1,2. Elle est
30 avantageusement complétée par deux bonnettes avec un total de 6 dioptries, pour obtenir un agrandissement proche de 1.

La caméra CCD 6 est du type de celles commercialisées par PRINCETON sous la dénomination "frame transfer". Elle permet de réaliser des acquisitions successives sans temps mort.

La surface active de la caméra est de 6 à 8 mm² avec une taille de
5 pixels de 22 μm/22μm.

La caméra est refroidie par effet Peltier jusqu'à -40° C environ.

Le laser est un laser argon (ILT) présentant une puissance maximale d'environ 10 mW à la longueur d'ondes de 488 nm.

Un prisme holographique permet d'éliminer toute longueur d'ondes
10 autre cette longueur d'ondes de 488 nm.

La matrice de séparation (gel ou autre) est injectée dans les capillaires au moyen d'une pompe qui permet d'appliquer une pression dans la cuvette de détection.

On présente ci-après les résultats qui ont été obtenus avec un tel
15 système pour une puissance de faisceau F laser de 8 mW et une distance entre les tranches de sortie des capillaires C et le point d'impact du faisceau F d'excitation de détection de 750 μm, en injectant, par voie électrocinétique ou avec un flux hydrodynamique des dilutions d'oligonucléotides d'une concentration connue.

20 La figure 8 donne, en fonction de la concentration des oligonucléotides injectée, le nombre de charges collectées sur 9 pixels (somme par le logiciel) après soustraction du signal des mêmes 9 pixels sans ADN dans les capillaires C. On constate une bonne linéarité sur deux ordres de grandeur.

25 En ce qui concerne la sensibilité minimale détectable, la figure 9 donne, en fonction de la puissance totale du laser, le rapport signal sur bruit (S/N) obtenu pour la concentration la plus faible (1,8nm) utilisée dans le cas d'une part d'une sommation sur 9 pixels (courbe B) et d'autre part dans le cas où l'on utilise des pixels ayant une taille 9 fois supérieure (courbe R).

30 La courbe B montre que pour cette concentration le rapport S/N est égale à 1.5 seulement. Cette sensibilité est satisfaisante pour les

expériences de génotypage, mais est limitée pour la concentration typique pour les bandes d'ADN dans les échantillons de séquençage.

Pour améliorer la sensibilité, on peut utiliser des pixels plus gros, par exemple regroupant 9 des pixels du précédemment envisagés. On obtient
5 alors une sensibilité environ trois fois plus élevée. Ceci vient du fait que le bruit de lecture de la caméra est presque neuf fois plus élevé si on lit 9 pixels individuellement, que s'ils sont regroupés en un seul pixel. La courbe R de la figure 9 montre le rapport S/N dans cette configuration.

Il est également possible de gagner en sensibilité en augmentant
10 simplement la puissance du laser. Un laser de 80 mW devrait permettre d'obtenir une sensibilité environ 6 fois supérieure à celle mesurée pour 8mW. Combiné avec le gain d'un facteur 3 dû au regroupement des pixels de la CCD, on atteint une amélioration en sensibilité d'un facteur 18 permettant le séquençage de l'ADN.

15 Par ailleurs, les tests mis en œuvre par les inventeurs ont montré que la sensibilité du système dépendait également de la position du point d'impact du laser par rapport à la sortie des capillaires C. Toutefois, celle-ci varie peu lorsque l'on fait varier la distance entre ledit point d'impact et la sortie d'1 mm à 250 μm , ce qui confirme que l'essentiel de la lumière sortant
20 par l'ouverture des capillaires C est effectivement collecté. Pour gagner encore en sensibilité, il faudrait alors s'approcher considérablement avec le faisceau F de la sortie des capillaires C. Un tel gain entraînerait une plus faible collimation de la lumière, ce qui dégraderait partiellement la résolution de l'image.

25 Pour montrer la capacité du système à séparer des bandes, les inventeurs ont fait un test de migration avec l'échantillon double brin (ϕ X174 de Gibco BRL) dans une solution de polymères (HPC 0,5%). Le marqueur utilisé était l'intercalaire SYBR(I) (Molecular Probes). Le résultat a été porté sur le graphe de la figure 10 pour deux capillaires C. Pour une
30 concentration d'1 $\text{ng}/\mu\text{l}$, les inventeurs ont obtenu un signal excellent des 11 bandes.

D'autres variantes que celle qui vient d'être décrite sont bien entendu envisageables. Notamment, les faisceaux de lumière de fluorescence en sortie des capillaires C – qui sont collimatés - peuvent être directement transmis à un ou plusieurs prismes intermédiaires pour séparer spatialement les différentes longueurs d'ondes émises et envoyer celles-ci sur un réseau de photodiodes.

La dépendance de la lumière récoltée en fonction de l'ouverture de l'objectif a également été testée. Le signal net, c'est-à-dire la soustraction du signal brut moins le bruit sont donnés en fonction de l'ouverture de l'objectif dans la figure 10. En partant d'une ouverture 16, on trouve une augmentation du signal jusqu'à l'ouverture 2,8, puis le signal sature. Ceci est dû à la directionnalité de la lumière émergente des capillaires C. Dès que le cône de lumière est complètement accepté par l'objectif, un agrandissement supplémentaire n'est plus utile. Au contraire, dans ce cas le rapport signal sur bruit diminue. Ceci est une preuve expérimentale supplémentaire pour la faisabilité et l'intérêt de la version illustrée sur la figure 12.

Sur cette figure 12, la lumière émise en sortie des différents capillaires C est récupérée par des fibres optiques FO présentant un diamètre légèrement supérieur au diamètre intérieur des capillaires C. Dans ce cas, on notera que la capture des photons ne nécessitent aucun élément optique intermédiaire étant donné que lesdits photons de fluorescence sortent par l'axe des capillaires C en étant sensiblement parallèles.

Les fibres optiques sont avantageusement couplées à des moyens de multiplexage optique M permettant de transmettre le signal reçu sur quatre capteurs photosensibles Ph correspondant à quatre longueurs d'ondes de fluorescence différentes.

Comme on l'aura compris, les systèmes qui viennent d'être décrits sont d'une conception simple et permettent d'atteindre des hauts débits avec une grande fiabilité et une grande facilité de mise en oeuvre

REVENDICATIONS

1. Système d'électrophorèse multicapillaire comportant une pluralité de
5 capillaires juxtaposés, au moins une source pour l'émission d'un
faisceau destiné à exciter des molécules se trouvant sur son trajet et à
l'intérieur des capillaires, des moyens pour détecter la fluorescence des
molécules excitées par ledit faisceau, caractérisé en ce que lesdits
moyens sont agencés de façon à réaliser une détection de la lumière qui
10 émerge en sortie desdits capillaires et qui se propage selon la direction
dans laquelle lesdits capillaires s'étendent.
2. Système selon la revendication 1, caractérisé en ce que la résolution
des moyens de détection est suffisante pour distinguer la lumière qui
émerge en sortie des capillaires de celle venant des parois de ceux-ci
15 et/ou du milieu qui les entoure.
3. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce
qu'un cache noir formant diaphragme est monté en sortie des capillaires.
4. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce
qu'il comporte une matrice de capillaires.
- 20 5. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce
que le faisceau d'excitation est de section droite elliptique et attaque
simultanément plusieurs capillaires superposés.
6. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce
que l'espace entre les capillaires est rempli, au moins sur la trajectoire
25 du faisceau d'excitation, par un matériau dont l'indice de réfraction est
choisi pour que le faisceau d'excitation ne diverge pas après avoir
traversé un capillaire.
7. Système selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit matériau
est transparent et non fluorescent.
- 30 8. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce
qu'il comporte des moyens pour appliquer dans la cuvette de détection,
une pression qui permet de remplir les capillaires avec la matrice de
séparation.

9. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un prisme intermédiaire pour séparer spatialement les différentes longueurs d'onde de fluorescence.
- 5 10. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte des guides optiques qui sont alignés avec les capillaires et récupèrent la lumière directionnelle en sortie de ceux-ci pour la guider sur des capteurs photosensibles.
- 10 11. Système selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comporte en outre des moyens de multiplexage, qui, en combinaison avec lesdits capteurs photosensibles, permettent une détection de différentes longueurs d'onde.

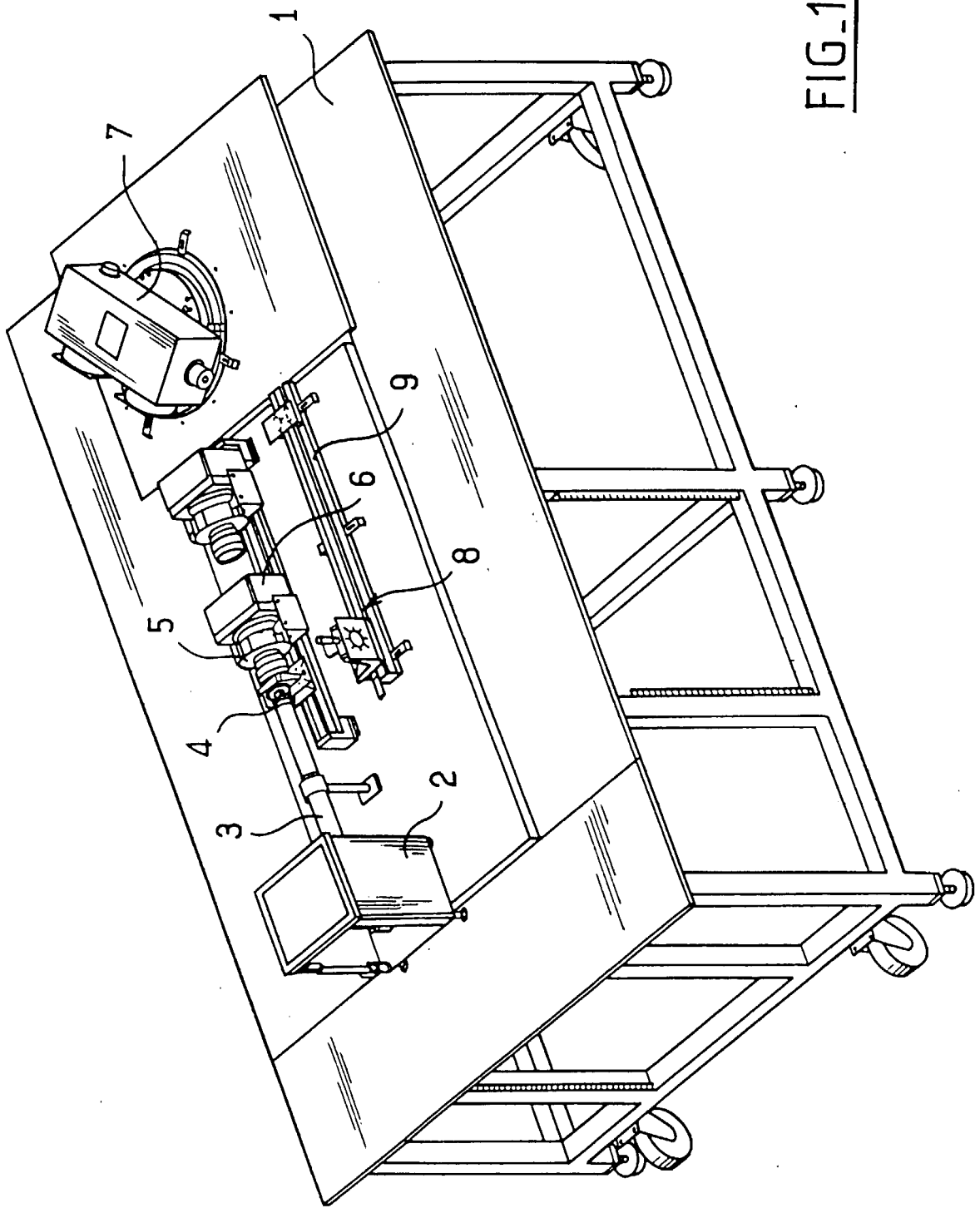
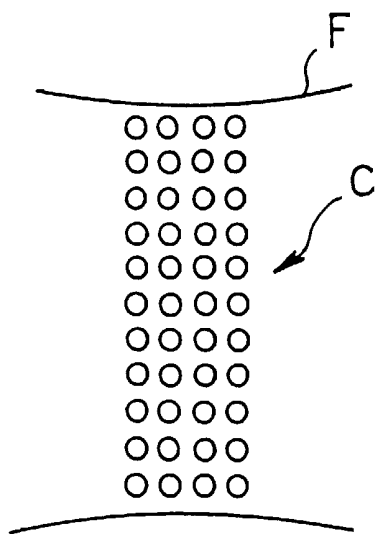
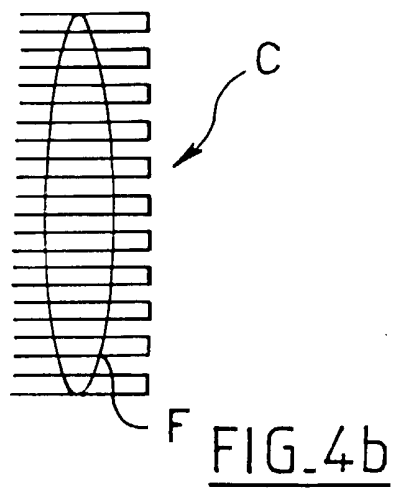
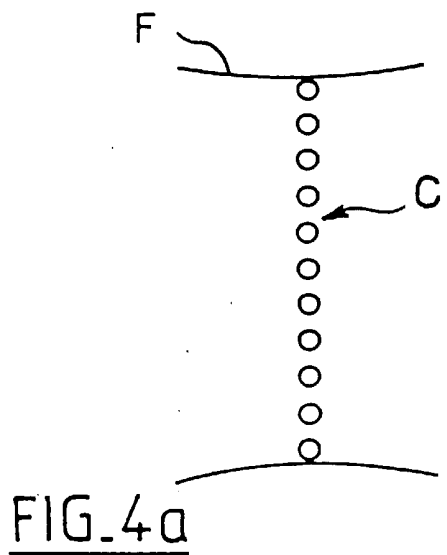
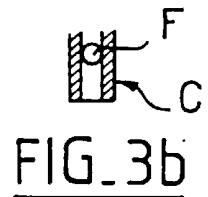
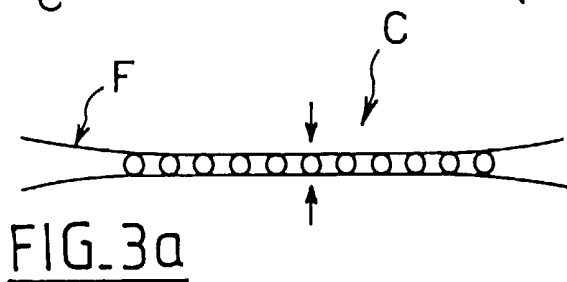
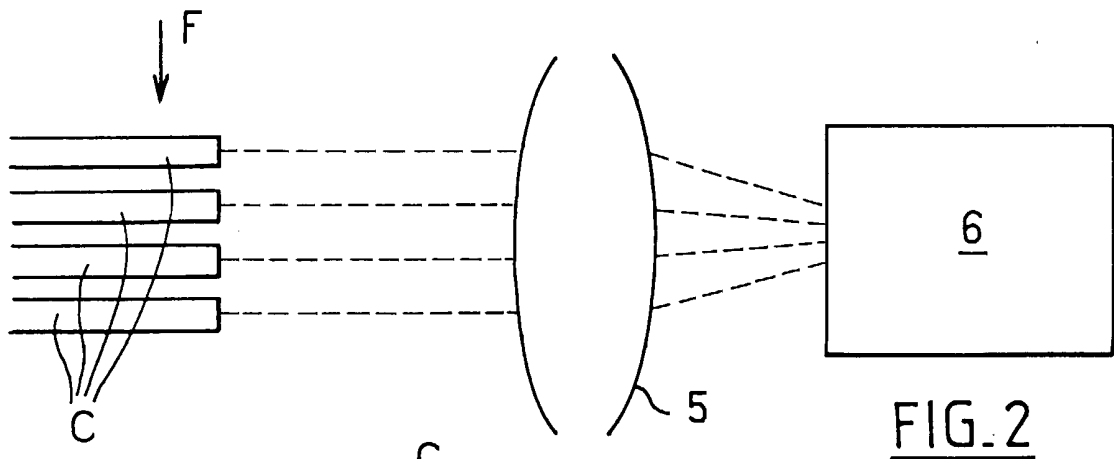


FIG-1



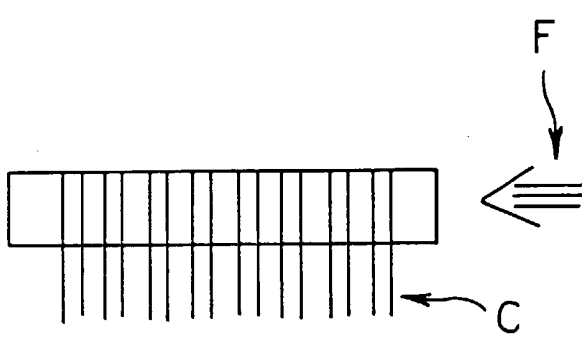


FIG. 6a

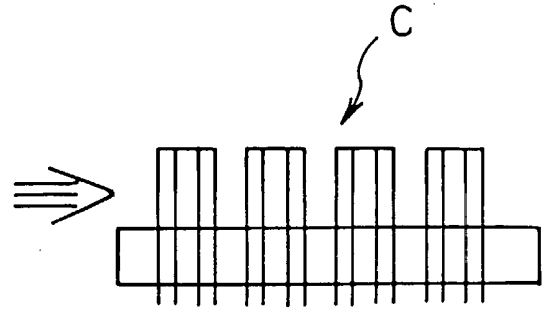


FIG. 6a

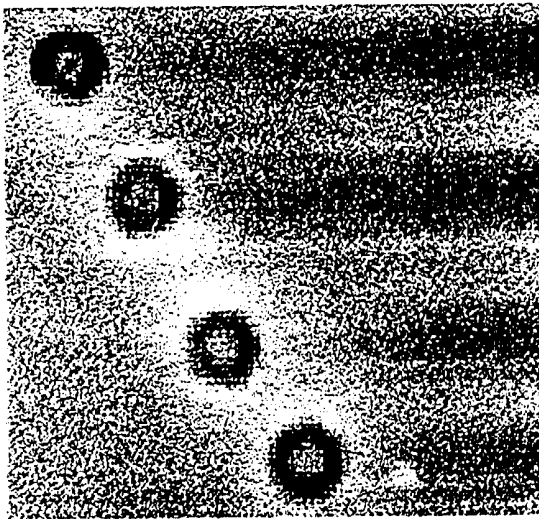


FIG. 7a

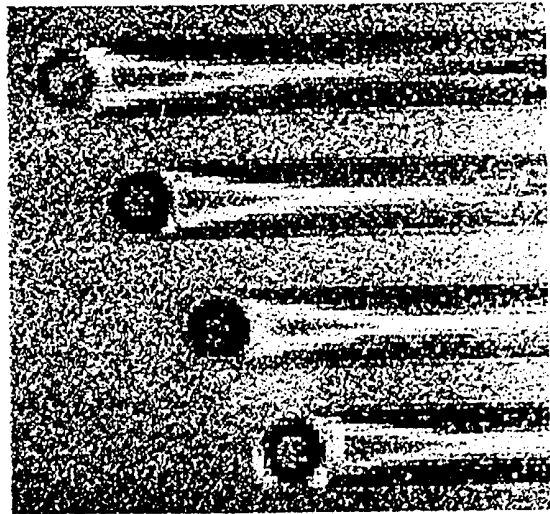
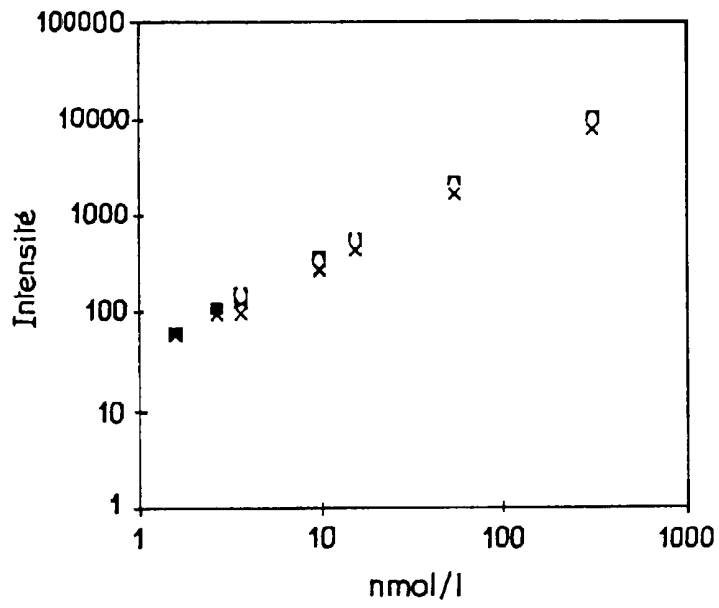
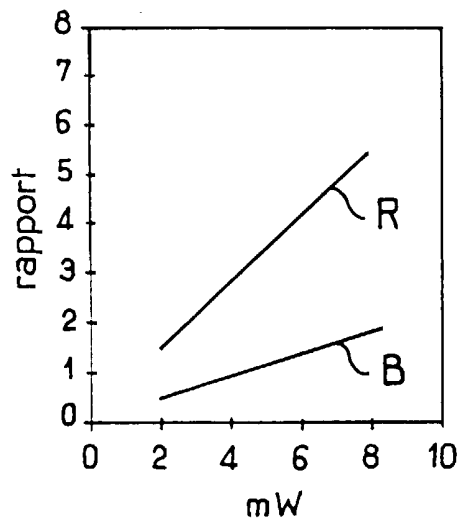


FIG. 7b

4 / 5

FIG. 8FIG. 9

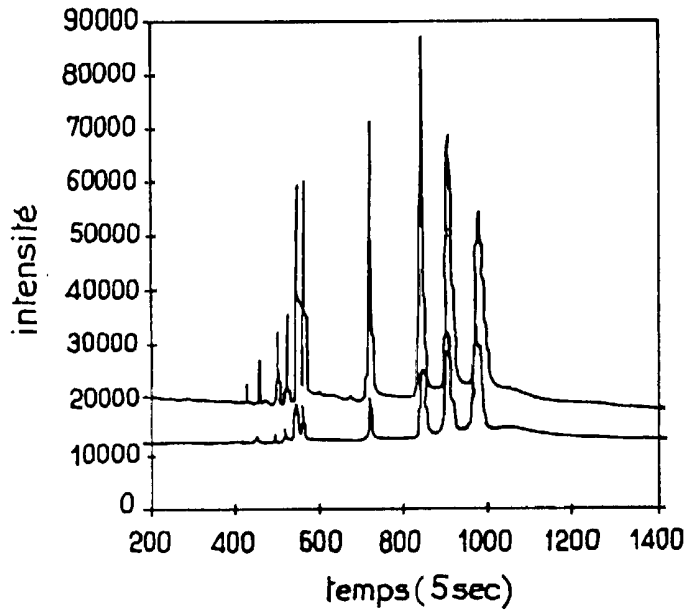


FIG.10

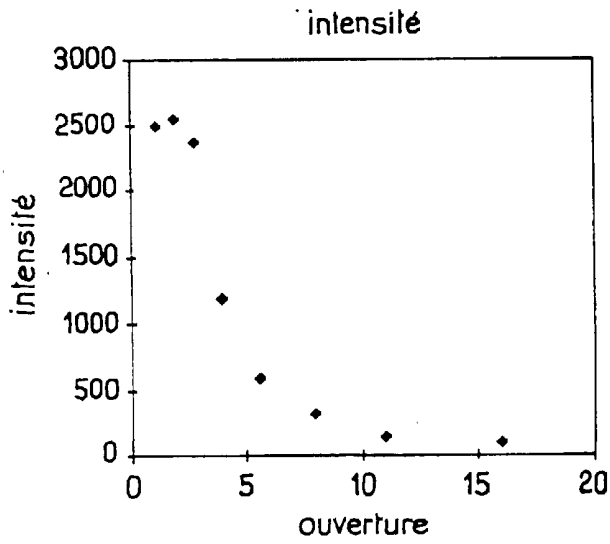


FIG.11

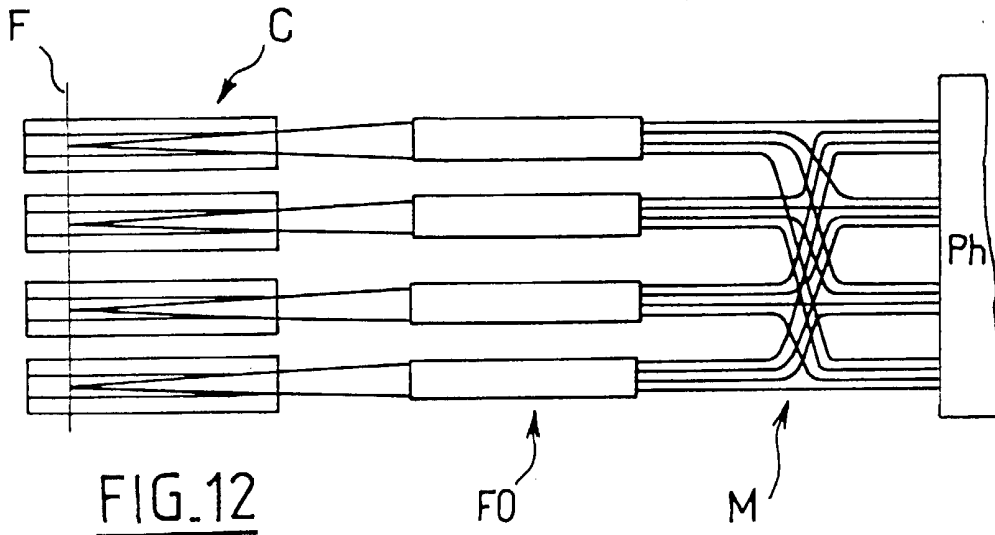


FIG.12

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 552885
FR 9801091

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	US 5 567 294 A (DOVICH I NORMAN J ET AL) 22 octobre 1996 * le document en entier *	1,2,4,5,8
Y	---	3,6,7,10,11
Y	WO 96 34278 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 31 octobre 1996 * page 9, ligne 26-29 *	3
Y	DE 196 16 824 A (HEWLETT PACKARD CO) 22 mai 1997 * colonne 1, ligne 10 - colonne 2, ligne 32 *	10
A	DOVICH I N J: "LASER-BASED MICROCHEMICAL ANALYSIS" REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, vol. 61, no. 12, 1 décembre 1990, pages 3653-3667, XP000177187 * page 3655, alinéa B; figure 4 *	1,10
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)		
X	EP 0 723 149 A (HITACHI LTD) 24 juillet 1996 * le document en entier *	1,2,4
Y	GB 2 312 505 A (HITACHI LTD) 29 octobre 1997 * page 3, ligne 23 - page 7, ligne 6 *	6,7
A	J. A. TAYLOR ET AL.: "axial-beam absorbance detection for capillary electrophoresis" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY., vol. 550, no. 1/2, 1991, pages 831-837, XP002080116 amsterdam, nl * figure 1 *	1
---		-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
9 octobre 1998		Brison, 0
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 552885
FR 9801091

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	US 5 324 401 A (YEUNG EDWARD S ET AL) 28 juin 1994 * abrégé *	11
A	WO 94 29712 A (UNIV ALBERTA ;DOVICH NORMAN J (CA); ZHANG JIAN ZHONG (CA)) 22 décembre 1994 * abrégé * * page 25 *	1,4,5
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
9 octobre 1998		Brison, 0
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>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</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1
EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)