

(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
25 janvier 2007 (25.01.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/009983 A1

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

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2006/064357

(22) Date de dépôt international : 18 juillet 2006 (18.07.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0552242 19 juillet 2005 (19.07.2005) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE** [FR/FR]; 25
Rue Leblanc, Immeuble "le Ponant D", F-75015 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **HAGUET,
Vincent** [FR/FR]; 6 Place Charles de Gaulle, F-38950
Saint-Martin-Le-Vinoux (FR). **PICOLLET-D'HAHAN,
Nathalie** [FR/FR]; Le Crozat, F-38580 La Ferrière (FR).
CHATELAIN, François [FR/FR]; Le Bressot, F-38470
Beaulieu (FR). **RIZO, Philippe** [FR/FR]; 25, Chemin De
Chantemerle, F-38700 La Tronche (FR).

(74) Mandataire : **POULIN, Gérard**; BREVATOME, 3, Rue
Du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

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

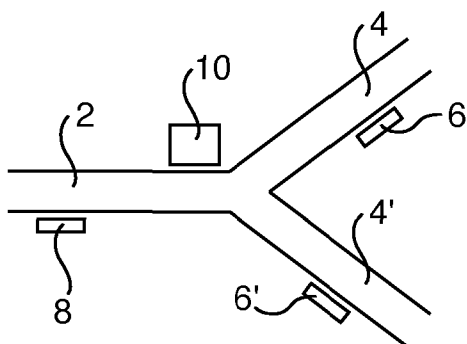
Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

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

(54) Title: METHOD OF CALIBRATING A PARTICLE FLUX SORTING DEVICE

(54) Titre : PROCÉDE DE CALIBRATION D'UN DISPOSITIF DE TRI EN FLUX DE PARTICULES



(57) Abstract: The invention relates primarily to a method of calibrating a particle flux sorting device comprising an inlet channel, at least two outlet channels, a particle-sorting means and at least one particle-detection means which is disposed in an outlet channel. The inventive method comprises a step consisting in setting at least one of the main operating parameters of the sorting means, from among the deflecting force to be applied to the particle by the sorting means and/or the length of time for the which the force is to be applied. The invention also relates to a method of correcting the operating parameters of a particle flux sorting device during the operation thereof, consisting in checking the effectiveness of the sorting operation and modifying at least one operating parameter until effective sorting is obtained.

(57) Abrégé : La présente invention a principalement pour objet un procédé de calibration d'un dispositif de tri en flux de particules, ledit dispositif comportant un canal d'entrée et au moins deux canaux de sortie, un moyen de tri de particules et au moins un moyen de détection de particules disposé dans un canal de sortie, ledit procédé comportant l'étape de réglage d'au moins un des paramètres de fonctionnement principaux du moyen de tri parmi la force de déviation apte à être appliquée par le moyen de tri à ladite particule et /ou la durée d'application de ladite force. La présente invention a également pour objet un procédé de correction des paramètres de fonctionnement d'un dispositif de tri en flux de particules pendant son fonctionnement, comportant les étapes : - de vérification de l'efficacité du tri, - de modification d'au moins un paramètre de fonctionnement jusqu'à obtenir au moins un tri efficace.

WO 2007/009983 A1

**PROCEDE DE CALIBRATION D'UN DISPOSITIF DE TRI
EN FLUX DE PARTICULES**

DESCRIPTION

DOMAINE TECHNIQUE ET ART ANTÉRIEUR

L'invention concerne le tri de particules
5 en suspension en vue de les séparer en plusieurs
populations et d'extraire les particules d'intérêt.
Plus spécifiquement, l'invention se rapporte à un
procédé de calibration efficace d'un dispositif de tri
en flux des particules ou de particules en suspension
10 dans un milieu, en particulier des microparticules
telles que des cellules en déplacement dans un canal
micro-fluidique, et d'autocalibration de ce dispositif
afin d'adapter en temps réel les paramètres de
fonctionnement du moyen de tri.

15 Des documents US 3 827 555 et US 3 984 307,
est connu un système de tri en flux de microparticules
comportant un canal d'entrée et deux canaux de sortie,
un moyen de tri à proximité en amont de l'embranchement
entre le canal d'entrée et les canaux de sortie, à
20 proximité de celui-ci et des détecteurs de particules
photoélectriques ou électriques dans chacun des canaux.
Le moyen de tri opère la séparation des particules de
manière individuelle en dirigeant chaque particule vers
la voie de sortie appropriée. Le moyen de détection
25 permet de vérifier si les particules circulant dans
chaque canal de sortie sont celles attendues. Cependant
ces contrôles a posteriori ne sont pas utilisés pour
modifier les paramètres de fonctionnement du dispositif

de tri en fonctionnement. Ainsi en cas de détection d'erreur, il faut arrêter le dispositif, le calibrer à nouveau avant de pouvoir poursuivre l'opération de tri.

5 Ce document décrit l'ajustement d'un paramètre appelé «délai» pour l'actionnement du moyen de tri formé, par exemple, par un transducteur piézoélectrique, en cas de variation de celui-ci.

Le détecteur en aval peut également être utilisé pour calculer la vitesse des particules et en
10 déduire le moment exact pour déclencher le moyen de tri.

Le développement des trieurs en flux de cellules a fait apparaître le besoin de paramétrer de façon efficace le moyen de tri.

15 Par exemple, dans le cas d'un trieur de cellules marquées par fluorescence (Fluorescence-Activated Cell Sorter, FACS), le temps de chute de la cellule entre le faisceau laser utilisé comme détecteur dans le canal d'entrée en amont du moyen de tri et les
20 plaques métalliques utilisées comme moyen de tri, doit être corrigé en temps réel pendant l'opération de séparation, afin de compenser les fluctuations de la vitesse de la cellule entre le détecteur et le moyen de tri résultant des variations de température dans la
25 pièce ou le liquide. Dans le FACS, le paramètre de correction est l'amplitude de vibration de la céramique piézoélectrique intégrée dans la buse. Cette amplitude de vibration permet de fixer le point de fractionnement du jet, donc le temps de trajet de la cellule entre le
30 faisceau laser et les plaques métalliques.

On peut distinguer deux phases pour la calibration du FACS :

- avant la phase de tri, l'amplitude de vibration initiale de la buse est réglée en déviant la
5 trajectoire de billes de diamètre calibré,
- pendant le tri, la dérive du point de fractionnement du jet est corrigée en temps réel en modulant l'amplitude de vibration de la buse. Cet ajustement continu peut être réalisé de façon
10 manuelle par l'opérateur ou sur la base d'une reconnaissance automatique d'image.

Dans le FACS, le moyen de tri se déclenche automatiquement après un certain intervalle de temps à la suite d'une détection. Cette technique impose de
15 maintenir constant le temps de chute de la particule.

Les procédés de calibrage des dispositifs de tri connus ne sont pas totalement fiables, en effet les paramètres de fonctionnement sur lesquels s'effectue le calibrage ne permettent pas une action
20 efficace dans le tri des particules.

En outre, ces procédés ne permettent pas de modifier le fonctionnement du dispositif de tri en cas d'erreur ou de variation des conditions d'utilisation (changement de la nature des particules et/ou de leur
25 vitesse et/ou de la viscosité du milieu), en ajustant en temps réel les paramètres de fonctionnement.

C'est par conséquent un but de la présente invention d'établir les paramètres efficaces de fonctionnement du moyen de tri et d'offrir un procédé
30 de calibration d'un dispositif de tri sur la base de ces paramètres.

C'est également un but de la présente invention d'offrir un procédé d'autocalibration permettant lors de la détection d'une erreur de tri d'ajuster les paramètres de fonctionnement pour obtenir
5 un tri fiable.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

Les buts précédemment énoncés sont atteints par un calibrage de la force de déviation exercée par le moyen de tri afin d'orienter la particule vers un
10 canal déterminé en fonction des caractéristiques de la particule et/ou par un calibrage de la durée pendant laquelle cette force de déviation est appliquée. Ce calibrage s'effectue avant l'étape de tri réel, à l'aide de moyens de détection placés dans au moins un
15 des canaux de sortie. Les moyens de détection permettent alors de modifier les paramètres de fonctionnement si une particule se trouve dans un canal auquel elle n'était pas destinée.

De manière avantageuse, la correction des
20 paramètres de fonctionnement se poursuit pendant tout le fonctionnement du dispositif de tri. Les paramètres mentionnés ci-dessus peuvent être ajustés pendant toute la phase de tri lorsqu'il est détecté qu'une particule a été mal orientée, c'est-à-dire qu'elle se trouve dans
25 le mauvais canal. Le fonctionnement du dispositif de tri de particules est plus flexible car il s'adapte à un changement de la vitesse des particules, de la nature des particules, de la viscosité du fluide,...

En d'autres termes, la présente invention a
30 pour objet un procédé pour :

- identifier a posteriori la voie de sortie empruntée par chaque particule après l'embranchement, et

- corriger en retour les paramètres de fonctionnement du moyen de tri si les particules ne sont pas dirigées vers la bonne voie de sortie.

La caractérisation issue de ce moyen de détection est utilisée pour corriger, s'il y a lieu, les paramètres de fonctionnement du moyen de tri. Dans le cas d'un tri actif des particules, c'est-à-dire dans le cas d'une activation des moyens de tri seulement lors de la détection d'une particule à dévier, l'activation du moyen de tri peut être déclenchée par un moyen supplémentaire de détection et d'analyse situé en amont de l'embranchement.

Appliquée au tri de cellules, la présente invention permet d'augmenter la fiabilité de la séparation des différentes populations cellulaires. Elle convient plus particulièrement dans des opérations de tri de grandes populations cellulaires et à débit élevé. L'invention peut également être mise en oeuvre en parallèle avec une cytométrie en flux des cellules réalisée en amont du moyen de tri et/ou en aval.

Le procédé selon la présente invention peut s'appliquer au cours de deux périodes d'utilisation :

- lors des réglages précédant l'opération de séparation,

- pendant l'opération de séparation, la dérive éventuelle du moyen de tri ou la dérive des conditions dans lesquelles il opère peuvent être

rapidement repérées, ce qui entraîne une recalibration immédiate du moyen de tri avec la méthode décrite.

Le procédé d'autocalibration selon l'invention permet le tri en flux de particules en suspension dans un dispositif microfluidique ou nanofluidique. Elle permet de contrôler le déclenchement d'un moyen de tri actif lors du passage d'une particule individuelle, de contrôler les paramètres de fonctionnement du moyen de tri actif ou bien les paramètres de fonctionnement d'un moyen de tri passif.

Un moyen de tri actif désigne un dispositif initialement au repos et qui se déclenche lors du passage de la particule afin de la diriger vers la voie de sortie appropriée. Un moyen de tri passif est un dispositif sans déclencheur qui crée de manière continue une perturbation dans la trajectoire des particules et qui les sépare individuellement sur la base de leurs caractéristiques intrinsèques.

L'invention concerne un procédé pour caractériser la position de particules entre au moins deux voies de sortie et calibrer les paramètres de fonctionnement, qui ont été déterminés comme particulièrement efficaces du moyen de tri (durée de l'actionnement du moyen de tri et force de déviation du moyen de tri). Un détecteur placé en aval du moyen de tri sur au moins une des voies de sortie permet d'identifier la voie empruntée par la particule après l'opération de séparation. Cette caractérisation est utilisée pour déterminer le succès ou l'échec de l'opération de tri pour chaque particule.

L'analyse en aval du moyen de tri peut être utilisée à deux niveaux d'opération :

- lors de la recherche des paramètres optimaux permettant d'effectuer la déviation des particules vers les voies de sortie appropriées,
- au cours de l'opération de tri, pour vérifier la trajectoire individuelle de chaque particule après le moyen de tri et corriger si nécessaire les paramètres de fonctionnement du moyen de tri par la méthode décrite.

L'autocalibration du moyen de tri des particules peut être réalisée manuellement par l'opérateur, mais il est également envisageable d'automatiser cette démarche par le biais d'un circuit électronique ou d'un logiciel afin d'avoir une réaction très rapide de l'appareil dès l'apparition d'une seule erreur.

Puisque les particules passent de façon successive dans le dispositif de séparation, des comptages peuvent être mis en oeuvre pendant les réglages de l'appareil et/ou pendant l'opération de séparation : énumération du nombre total de particules traversant le dispositif, et/ou énumération du nombre de tris réussis et/ou énumération du nombre de tris échoués. Il est également possible d'utiliser les détecteurs en aval pour compter les particules passant dans chaque voie de sortie.

L'invention se rapporte donc à la calibration et à la régulation en continu d'un moyen automatisé de tri en flux de particules. Le fluide en circulation peut être un liquide ou une solution, ou

une suspension, ou un milieu contenant des cellules biologiques, et/ou des composants et/ou des produits cellulaires, notamment des lignées cellulaires et/ou des globules, et/ou des liposomes, et/ou des noyaux
5 cellulaires, et/ou des chromosomes, et/ou des brins d'ADN ou d'ARN, et/ou des nucléotides, et/ou des ribosomes, et/ou des enzymes, et/ou des protides, et/ou des protéines, et/ou des parasites, et/ou des bactéries, et/ou des virus, et/ou des pollens et/ou des
10 polymères. Les particules manipulées peuvent également être des particules solides insolubles dans le liquide telles que des particules diélectriques ou des particules conductrices, ou des particules magnétiques, ou des pigments, ou des colorants, ou des cristaux de
15 protéines, ou des poudres, ou des structures de polymères, ou des substances pharmaceutiques insolubles, ou des clusters de petite taille formés par agglomération de colloïdes. Les particules manipulées peuvent également être des gouttelettes de liquide
20 et/ou des bulles de gaz confinées et séparées par un autre fluide immiscible avec les gouttelettes et/ou les bulles transportées.

La méthode d'autocalibration selon l'invention est compatible avec l'ensemble des moyens
25 de tri et des détecteurs décrits dans la littérature.

La solution proposée permet donc de mettre en évidence les erreurs dès qu'elles se produisent et de corriger en conséquence le moyen de tri en temps réel. Pour un tri actif, les paramètres de correction
30 du moyen de tri sont de trois ordres : délai avant le déclenchement, durée d'actionnement et force de

déviations. Pour un tri passif, le paramètre de fonctionnement est la force de déviation.

La méthode d'autocalibration d'un moyen de tri de particules est particulièrement intéressante pour des industriels de l'instrumentation pour la biologie, principalement pour séparer deux populations cellulaires et éventuellement en association avec une cytométrie en flux.

La présente invention a alors principalement pour objet un procédé de calibration d'un dispositif de tri en flux de particules, ledit dispositif comportant un canal d'entrée et au moins deux canaux de sortie, un moyen de tri de particules et au moins un moyen de détection de particules disposé dans un canal de sortie, ledit procédé comportant l'étape de réglage d'au moins un des paramètres de fonctionnement principaux du moyen de tri parmi la force de déviation apte à être appliquée par le moyen de tri à ladite particule et/ou la durée d'application de ladite force.

Le réglage du paramètre principal peut comporter :

- le choix d'une valeur de paramètre,
- la mesure de l'efficacité de cette valeur par vérification de la réussite d'un tri,
- la modification de la valeur du paramètre jusqu'à obtenir au moins un tri réussi.

Le procédé de calibration selon la présente invention comporte avantageusement l'étape supplémentaire de détermination d'un intervalle de valeurs efficaces pour le paramètre principal.

Cette détermination d'un intervalle de valeurs efficaces peut comporter, par exemple la détermination des bornes de l'intervalle à partir d'une valeur efficace du paramètre principal.

5 Pour cela :

- la valeur efficace est modifiée,
 - l'efficacité de cette valeur modifiée est testée,
 - la valeur est augmentée ou réduite en
- 10 fonction du résultat du test d'efficacité.

Le procédé de calibration selon la présente invention s'applique également à un dispositif apte à trier au moins une première et une deuxième populations de particules d'intérêt, le procédé selon une première

15 variante peut comporter alors également les étapes :

- de détermination d'un premier intervalle de valeurs efficaces du paramètre principal pour la première population de particules,
 - de détermination d'un deuxième
- 20 intervalle de valeurs efficaces du paramètre principal pour la deuxième population de particules,
- de choix des valeurs de paramètre principal pour les première et deuxième populations dans les premier et deuxième intervalles
- 25 respectivement.

Dans le cas d'un dispositif de tri passif, le choix d'une valeur unique du paramètre principal pour les différentes populations, peut s'effectuer dans un intervalle de recouvrement entre le premier et le

30 deuxième intervalles.

Le procédé de calibration selon une deuxième variante, pour calibrer un dispositif apte à trier au moins une première et une deuxième population de particules d'intérêt, peut comporter les étapes :

- 5 - de détermination d'un premier intervalle de valeurs efficaces du paramètre principal pour la première population de particules,
- de détermination d'une valeur efficace du paramètre principal pour la deuxième population dans
10 le premier intervalle,
- de détermination d'un deuxième intervalle de valeurs efficaces pour la deuxième population dans le premier intervalle,
- de choix des valeurs du paramètre
15 principal pour la première et la deuxième populations dans les premier et deuxième intervalles respectivement.

Dans le cas d'un dispositif de tri passif, une valeur unique du paramètre principal peut être
20 déterminée pour les différentes populations dans le deuxième intervalle.

De manière avantageuse, d'autres paramètres de fonctionnement du dispositif peuvent être réglés, tels que la durée avant déclenchement correspondant au
25 temps écoulé entre la détection d'une particule dans le canal d'entrée en amont du moyen de tri et le passage de ladite particule au niveau du moyen de tri.

La durée avant déclenchement peut être obtenue à partir de la détermination de la vitesse de
30 déplacement d'une particule d'intérêt dans le dispositif de tri.

Dans ce cas, le moyen de tri peut être ou ne pas être activé lors de la détermination de la vitesse de la particule.

La vitesse de la particule peut être
5 obtenue à partir d'un signal de détection fourni par un moyen de détection amont, ou un moyen de détection d'un canal de sortie et de la distance entre ces deux détecteurs.

La vitesse de la particule peut également
10 être calculée à partir de la durée d'un pic de détection fourni par un détecteur dans le canal d'entrée et/ou par un détecteur dans un canal de sortie et de la distance parcourue par la particule entre un début et une fin de ce pic.

15 La détermination de la durée avant déclenchement peut alors comporter :

- le choix d'une valeur de durée avant déclenchement, les valeurs de la force de déviation et de la durée d'activation étant maintenues constantes,
- 20 - l'essai de l'efficacité de cette valeur,
- la modification de cette valeur jusqu'à obtention d'un tri réussi.

Le procédé selon la présente invention comporte avantageusement l'étape de détermination d'un
25 intervalle de valeurs efficaces pour la durée avant déclenchement, dans laquelle à partir d'une valeur de durée de déclenchement efficace, des essais de tri efficace sont effectués avec des valeurs de durée augmentées et/ou diminuées par rapport à la valeur
30 adaptée.

La présente invention a également pour objet un procédé de correction des paramètres de fonctionnement d'un dispositif de tri en flux de particules en fonctionnement, comportant les étapes :

- 5 - de vérification de l'efficacité du tri,
 - de modification d'au moins un paramètre de fonctionnement jusqu'à obtenir au moins un tri efficace.

La vérification de l'efficacité du tri peut
10 s'effectuer en permanence ou à des intervalles de temps prédéterminés.

De manière avantageuse, un premier paramètre est modifié jusqu'à obtenir un tri efficace.

Il peut être prévu de modifier un paramètre
15 supplémentaire si un tri efficace n'est pas obtenu.

Les paramètres de fonctionnement aptes à être corrigés par le procédé selon la présente invention sont au moins la force de déviation appliquée par le moyen de tri, la durée d'application de cette
20 force et/ou le temps entre la détection de la particule à l'entrée du dispositif et son passage au niveau du moyen de tri.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

La présente invention sera mieux comprise à
25 l'aide de la description qui va suivre et des dessins en annexe, sur lesquels :

- les figures 1a-1b, 2a à 2h, 3a-3b, 4a-4b sont des représentations schématiques de différents dispositifs de tri en flux de particules,

- les figures 5a à 5d, 6a à 6f, 7a à 7d représentent différents dispositifs de tri en flux de particules avec leur chronographe associé montrant la détection d'une particule,

5 - les figures 8a à 8c, 9a à 9d et 10a à 10d sont des chronographes montrant les différentes étapes dans la recherche de la durée avant déclenchement selon la présente invention,

10 - les figures 11a à 11f sont des chronographes montrant les différentes étapes dans le réglage d'un intervalle de valeurs de la durée d'actionnement pour lesquelles la particule est correctement déviée,

15 - les figures 12a à 12c sont des chronographes montrant les différentes étapes dans le réglage d'un intervalle de valeurs de la force de déviation pour lesquelles la particule est correctement déviée,

20 - la figure 13 est un organigramme d'un procédé de calibration selon la présente invention,

25 - les figures 14a à 14d, 15a à 15f et 16a à 16d représentent différents dispositifs de tri en flux de particules avec leur chronographe associé montrant la détection d'une particule pour le réglage de la force de déviation,

 - les figures 17a à 17c et 18a à 18c sont des chronographes montrant les différentes étapes dans la recherche de la force de déviation selon la présente invention,

30 - la figure 19 est un organigramme d'un procédé de calibrage selon la présente invention,

- les figures 20 et 21 sont des organigrammes du procédé selon la présente invention dans le cas où plusieurs populations sont d'intérêt,
- la figure 22 est une représentation schématique d'un distributeur de cellules apte à être calibré par un procédé selon la présente invention,
- la figure 23 est un organigramme d'un procédé d'autocalibration selon la présente invention,
- la figure 24 est un organigramme pour une étape particulière du procédé d'autocalibration de la figure 23.

EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS

Sur les figures 1a et 1b, on peut voir un dispositif de tri en flux de particules de type connu comportant un canal d'entrée 2 dans lequel circule le flux chargé des particules à trier, deux canaux (figure 1a) de sorties 4,4' (trois canaux de sortie sur la figure 1b) recevant chacun des particules déterminées. Le dispositif comporte également un détecteur 6,6' de particules dans chaque canal de sortie 4, 4'. Nous verrons plus tard que le dispositif peut ne comporter qu'un canal de sortie muni d'un détecteur de particules.

Dans l'exemple représenté, le canal d'entrée 2 comporte également un détecteur de particule 8, qui peut permettre de les analyser individuellement.

Un moyen de tri 10 est également prévu dans le canal d'entrée en amont des canaux de sortie 4,4' dans le sens de circulation du flux indiqué par la flèche A

Le nombre de canaux de sortie n'est pas limité à trois, il peut être de quatre ou plus.

Il existe un tri de particules dit actif ; un détecteur 8 situé en amont du moyen de tri permet de
5 détecter et d'analyser les particules une à une et de commander le moyen de tri. Ces moyens sont configurés ou programmés pour détecter certaines particules ou cellules. Le moyen de tri est ainsi déclenché à la suite de la détection en amont, éventuellement selon le
10 résultat d'une opération de cytométrie en flux.

Lors de leur trajet, les particules sont détectées en flux une première fois par le détecteur en amont du moyen de tri, et une seconde fois par le détecteur en aval du moyen de tri dans une des voies de
15 sortie si cette voie est équipée d'un détecteur. La distance entre le détecteur en amont et le détecteur en aval étant connue précisément, la vitesse moyenne des particules dans le flux peut être calculée. La durée nécessaire à une particule pour effectuer le trajet
20 entre le détecteur en amont et le moyen de tri peut alors être déduite.

Dans une configuration, la détection d'une particule en amont du moyen de tri peut déclencher une horloge sur le circuit électronique pilotant les
25 détecteurs en aval afin de caractériser le passage de la particule dans un intervalle de temps prédéfini. Dans une autre configuration, les détecteurs en aval sont toujours opérationnels, et le signal de détection en aval est associé par le circuit électronique au
30 signal de détection en amont le plus récent et/ou le plus probable.

Il existe également un tri de particules dit passif. Le moyen de tri exerce continûment une force de déviation afin de dévier les particules de manière passive vers la voie de sortie appropriée. Les
5 particules subissent toutes la même force de déviation et sont séparées individuellement sur la base de leurs propriétés intrinsèques ou de leurs propriétés associées par marquage. La calibration du moyen de tri est entièrement pilotée par la détection en aval des
10 particules. L'identification de chaque particule par un détecteur en aval permet de valider la réussite ou l'échec de l'opération de tri.

Le procédé décrit dans cette invention est indépendant du nombre de canaux de sortie. Dans le cas
15 d'un tri actif, les paramètres de fonctionnement du moyen de tri peuvent être différents pour chaque voie de sortie et sont donc établis indépendamment pour chacune d'entre elles en appliquant la méthode décrite. Au contraire, pour un tri actif, les paramètres de
20 fonctionnement du moyen de tri sont communs à toutes les voies de sortie et sont donc établis simultanément en appliquant la méthode décrite.

Un détecteur donné est excité en continu par une source dont la nature est liée au type de
25 détecteur utilisé. La source est par exemple une source lumineuse pour une détection optique, ou une électrode pour une détection des particules par impédancemétrie. Le passage d'une particule entre la source et le détecteur est à l'origine d'une modification temporaire
30 du signal mesuré.

La forme du signal de détection peut éventuellement donner des informations sur la particule.

Les détecteurs peuvent être de différents types, par exemple il peut s'agir de détecteurs optiques : la détection optique des particules utilise un ou plusieurs photodétecteurs pour mesurer les caractéristiques optiques indiquant le passage d'une particule individuelle, telles que la diffusion ou la diffraction ou le degré d'extinction du faisceau lumineux, ou la lumière émise par la particule par fluorescence, autofluorescence (fluorescence intrinsèque) ou chemiluminescence.

Les composants optiques, généralement assemblés ou construits dans le substrat servant de support aux canaux fluidiques, peuvent être des fibres optiques, des guides d'onde monolithiques ou des photo-détecteurs planaires tels que des photomultiplicateurs, des détecteurs à avalanche, des capteurs CMOS (complementary metal oxide semi-conductor), des capteurs CCD (charge-coupled device). Dans une configuration, la trajectoire des particules est déterminée par au moins un capteur optique positionné à proximité de la voie d'entrée et/ou d'au moins une voie de sortie.

Dans une autre configuration, un photo-détecteur planaire est placé à proximité des canaux fluidiques de telle manière qu'il permet l'observation simultanée des particules dans au moins deux voies de sortie et éventuellement dans la voie d'entrée. La résolution spatiale du photo-détecteur

permet de détecter et éventuellement de caractériser les particules dans les canaux fluidiques. Le même photo-détecteur planaire permet d'analyser plusieurs voies de sortie, et éventuellement la voie d'entrée, en définissant différentes zones sur le photo-détecteur planaire, chacune de ces zones étant dédiée à une voie particulière. Les pixels recevant un signal optique en provenance des voies de sortie ou d'entrée permettent de déterminer la présence ou l'absence des particules dans les voies concernées et ainsi de mettre en œuvre le procédé de calibration décrit dans ce brevet. Les pixels du photo-détecteur planaire placés à proximité des voies de sortie sont utilisés pour vérifier que la voie empruntée par la particule est bien celle appropriée. Les pixels du photo-détecteur planaire placés à proximité de la voie d'entrée permettent de caractériser les particules en amont du moyen de tri, par exemple en vue d'un tri actif des particules.

Il peut également s'agir de détecteur électrique, la détection et la caractérisation par impédancemétrie de particules ou de cellules vivantes non marquées est basée sur la variation de l'impédance mesurée entre deux électrodes lors du passage de la particule. La perturbation électrique peut être due à la différence de conductivité entre la particule et le fluide porteur ou aux propriétés électriques intrinsèques de la particule.

Des détecteurs à fonctionnement thermique, mécanique, magnétique, électrochimique, ... peuvent également convenir.

Nous allons maintenant expliquer le fonctionnement d'un tel dispositif.

Un flux chargé de particules à trier est injecté dans le canal d'entrée 2. Le détecteur 8 repère
5 une ou des particules déterminées, qui doivent être envoyées dans le canal de sortie 4.

L'information est envoyée à une unité de commande (non représentée) qui génère un ordre d'activation au moyen de tri. Comme décrit
10 précédemment, un délai ou durée avant déclenchement est généralement prévu avant l'activation du moyen de tri correspondant au temps de parcours de la ou des particules.

Le moyen de tri s'active alors au moment du
15 passage de la ou des particules déterminées et provoque une déviation de la trajectoire de la ou des particules pour les orienter vers le canal 4.

Des moyens de tri ont été développés pour le tri en flux de cellules ou de particules
20 individuelles dans une puce microfluidique.

Le tri des microparticules peut être de type passif, c'est-à-dire selon des critères physiques inhérents ou associés à la microparticule.

Il peut être également de type actif, et
25 mis en oeuvre après une observation des microparticules à travers un système de caractérisation en amont du moyen de tri.

Différents moyens de tri mettant en oeuvre un tri actif ou passif sont rappelés ici, par exemple :

30 - des moyens utilisant des paramètres physiques, tels que la masse (déviation de la

trajectoire par gravitation), la taille (déviations par filtration) ou la densité (déviations par force centrifuge) employés pour séparer une suspension hétérogène de microparticules,

5 - des moyens utilisant une séparation de cellules selon leur taille grâce au profil parabolique des vitesses d'un liquide en déplacement entre deux plaques, moyens décrits dans le document US 5 039 426,

10 - des moyens de tri utilisant la séparation immunomagnétique en flux décrite dans le document WO 03/045565. Cette séparation est basée sur le marquage des cellules d'intérêt avec un anticorps couplé à une nanoparticule superparamagnétique. En
15 présence d'un champ magnétique, les cellules marquées sont entraînées vers une voie de sortie spécifique.

 - des moyens utilisant la diélectrophorèse, telle que décrite par S. Fiedler et al. (Anal. Chem., 70, 1909-1915, 1998), un champ électrique à haute
20 fréquence est appliqué pour diriger les particules sélectionnées vers une des voies de sortie.

 - Des particules diélectriques de taille et d'indice de réfraction différents peuvent être séparées en flux par des moyens optiques en distribuant
25 le champ optique selon une géométrie appropriée (M. P. MacDonald et al., Nature, 426, 421-424, 2003).

 - La trajectoire de la particule en suspension dans un flux laminaire peut également être contrôlée avec des pinces optiques (par exemple, Wang
30 et al., Nat. Biotechnol., 23(1), 83-87, 2005).

- N. Sundararajan et al. (Lab. Chip, 5, 350-354, 2005) ont présenté un moyen de tri de microparticules par pression pneumatique basé sur des microcanaux fabriqués dans un matériau plastique déformable. Un changement transitoire de la direction du fluide transportant les microparticules est produit en contrôlant le diamètre des différentes voies de sortie.

- L'utilisation d'une onde de pression pour dévier la trajectoire d'une particule vers la voie de sortie appropriée est particulièrement adaptée pour des particules en suspension dans un liquide. L'onde de pression peut être générée par différents moyens qui comportent un actionnement piézoélectrique, acoustique, électromécanique, pneumatique ou thermique, par le biais d'un matériau piézoélectrique, d'un transducteur électroacoustique, d'un actionneur mécanique, d'un piston ou d'une électrovanne, ou d'une résistance chauffante.

Cette liste n'est pas limitative, et tout autre moyen approprié peut convenir.

Les figures 2a à 2h représentent le cas où une ou plusieurs voies de sortie 4,4' ne disposent pas de détecteur 6,6' de particules en aval. Ces configurations peuvent être employées dans deux situations :

- lorsque la déviation de la particule vers la voie de sortie sans détecteur est déduite de l'absence de signal provenant des détecteurs situés sur les autres voies de sortie,

- lorsque seules les voies de sortie munies de détecteurs constituent les voies d'intérêt pour la caractérisation de l'opération de tri. Il n'est alors pas considéré comme nécessaire de contrôler la présence des particules dirigées vers les voies de sortie sans détecteur.

Dans les dispositifs des figures 2a et 2b, le canal d'entrée 2 comporte un détecteur 8 et un seul des deux canaux 4,4' comporte un détecteur 6,6'.

10 Les dispositifs des figures 2c à 2e comportent un détecteur 8 dans le canal d'entrée 2 et trois voies de sorties 4,4',4''. Deux des trois voies comportent un détecteur 6,6',6''.

15 Les dispositifs des figures 2f à 2h comportent également trois canaux 4,4',4'', un détecteur dans le canal d'entrée 2 et un seul canal de sortie 4,4',4'' muni d'un détecteur 6,6',6''.

20 Les figures 3a et 3b représentent le cas où la voie d'entrée ne dispose pas de détecteur de particules et tous les canaux de sortie comportent un détecteur. Seuls deux cas sont représentés sur la figure 3, mais le nombre de voies de sortie peut être supérieur.

25 Les figures 4a et 4b, représentent le cas où le canal d'entrée 2 ne dispose pas de détecteur et où un des canaux de sortie 4,4',4'' ne comporte pas de détecteur. Seuls deux cas sont représentés sur la figure 4. Ici encore, le nombre de voies de sortie peut être supérieur.

30 Les configurations représentées par les figures 1 et 2 (présence d'un détecteur en amont 8)

peuvent être appliquées indifféremment à un moyen de tri actif ou passif, tandis que les configurations représentées par les figures 3 et 4 (absence d'un détecteur en amont) sont mises en oeuvre uniquement
5 avec un moyen de tri passif.

Ce dispositif de tri fonctionne de manière satisfaisante, cependant il est souhaitable d'augmenter davantage sa fiabilité.

Les inventeurs ont déterminé deux
10 paramètres de fonctionnement du moyen de tri dont l'ajustement est particulièrement efficace pour améliorer la fiabilité du tri, c'est-à-dire pour provoquer les séparations des particules d'intérêt des autres particules contenues dans le flux.

15 En effet, les inventeurs ont constaté que l'intensité de la force avec laquelle la ou les particules étaient déviées et la durée d'application de cette force permettaient d'augmenter sensiblement la fiabilité du dispositif de tri.

20 Le procédé de calibration selon la présente invention comporte par conséquent l'étape d'ajustement de l'intensité de la force de déviation appliquée par le moyen de tri et/ou la durée d'impulsion pendant laquelle cette force est appliquée.

25 Nous allons maintenant exposer le procédé de calibration de la force de déviation selon la présente invention.

Pour la calibration, on peut faire circuler un flux de particules étalons dans le dispositif ou les
30 particules à trier par la suite.

Le dispositif de séparation représenté à la figure 14b, ne dispose d'aucun détecteur 8 en amont du moyen de tri. Dans ce cas, les détecteurs en aval 6, 6' sont toujours opérationnels (fonctionnement passif).

5 Comme le montre la figure 14d, un détecteur 8 peut éventuellement être présent en amont du moyen de tri, mais ce détecteur 8 n'est pas utilisé pour déclencher le moyen de tri 10. Dans une configuration, le détecteur en amont 8 permet de déclencher une
10 horloge sur le circuit électronique pilotant les détecteurs 6,6' en aval afin de caractériser le passage de la particule dans un intervalle de temps prédéfini. Dans une autre configuration, les détecteurs 6,6' en aval sont toujours opérationnels, et le signal de
15 détection en aval est associé par le circuit électronique au signal de détection en amont le plus récent et/ou le plus probable.

Dans la suite de la description, la forme du signal de détection d'une particule correspondant à
20 une perturbation du signal mesuré due au passage d'une particule entre la source de flux et le détecteur est représentée sur les chronogrammes de façon schématique par un signal en créneau.

Les figures 14a et 14c montrent des
25 chronogrammes types pour les dispositifs 14b, 14d respectivement, dans lesquels :

- mt représente la force appliquée sur le moyen de tri 10,
- d1 est le signal mesuré par le détecteur
30 6 en aval dans la voie de sortie 4,

- d2 est le signal mesuré par le détecteur 6' en aval dans la voie de sortie 4',

- d0 représente le signal mesuré par le détecteur 8 en amont, si celui-ci est présent dans le
5 dispositif de séparation.

Les pics de détection p0, p1, p2 sur les diagrammes d0, d1 ou d2 respectivement, des figures 14a et 14c représentent le passage d'une particule devant les détecteurs 8, 6, 6' sur les figures 14b et 14d.
10 Lorsque la particule est déviée par le moyen de tri 10 vers une certaine voie de sortie 4, 4', le détecteur 6, 6' de cette voie de sortie 4, 4' uniquement produit un pic de détection p1, p2. Sur les chronogrammes, l'amplitude du pic p0, p1, p2 de détection est
15 arbitraire, tandis que la largeur du pic de détection indique le temps de présence de la particule devant le détecteur. La forme des pics de détection est simplifiée par un signal en créneau, mais la forme réelle du signal de détection peut éventuellement
20 apporter des informations sur la particule selon le type de détecteur employé.

La base du signal mt, c'est-à-dire la force appliquée lorsque le moyen de tri est au repos, peut correspondre à une force de déviation nulle ou non
25 nulle, selon le moyen de tri employé. La base des signaux d0, d1 et d2 peut correspondre à un signal mesuré nul ou non nul, selon les détecteurs employés et l'environnement dans lequel ils sont utilisés.

Le fonctionnement du moyen de tri est
30 caractérisé par l'amplitude F de la force de déviation du moyen de tri 10. Sur les chronogrammes représentant

le signal mt , la ligne inférieure en pointillés indique la base du signal mt , c'est-à-dire la force de déviation appliquée lorsque le moyen de tri 10 est au repos. La ligne supérieure en trait plein indique la force appliquée sur le moyen de tri 10 pendant son utilisation.

Le nombre de voies de sortie 4, 4' n'est pas limité: il peut y avoir autant de signaux que de voies de sortie 4, 4' possibles pour les particules. Par la suite, nous décrirons le cas où le dispositif de tri est équipé de deux voies de sortie 4, 4', mais le procédé s'applique à un nombre supérieur de voies de sortie avec un raisonnement similaire.

Les figures 15a à 15f montrent de quelle manière la lecture des signaux des détecteurs en aval renseigne sur la réussite ou l'échec du tri de la particule. Dans cet exemple, on souhaite que la particule soit dirigée par le moyen de tri vers la voie de sortie 4 munie du détecteur 6.

Le dispositif des figures 15b, 15d, 15f comportent deux canaux de sortie 4, 4', les deux sont munis d'un détecteur 6, 6' et le canal d'entrée 2 comporte également un détecteur 8.

Trois cas sont représentés :

- le chronogramme de la figure 15a, associé au dispositif de la figure 15b représente le cas où la force de déviation du moyen de tri 10 est insuffisante. Le pic de détection p_2 sur le diagramme d_2 montre que la particule a emprunté la mauvaise voie de sortie 4',
- le chronogramme de la figure 15c, associé au dispositif de la figure 15d représente le cas où la

force de déviation est appropriée. Le tri de la particule est réussi, car le pic de détection p1 sur le diagramme d1 montre que la particule a emprunté la bonne voie de sortie 4,

5 - le chronogramme de la figure 15e, associé au dispositif de la figure 15f représente le cas où la force de déviation est trop importante. Le pic de détection p2 sur le diagramme d2 montre que la particule a emprunté la mauvaise voie de sortie 4'.

10 Les figures 16a à 16d montrent le fonctionnement d'un dispositif dont la voie de sortie 4'ne dispose pas de détecteur. La direction prise par la particule est déduite par la présence ou l'absence d'un pic de détection p1 dans la voie de sortie 4 munie
15 d'un détecteur 6.

Deux cas sont représentés :

 - sur le chronogramme de la figure 16a associé au dispositif de la figure 16b, le pic de détection p1 sur le diagramme d1 montre que la
20 particule a emprunté la voie de sortie 4,

 - sur le chronogramme de la figure 16c, associé au dispositif de la figure 16d, l'absence de pic de détection p1 sur le diagramme d1 montre que la particule a emprunté la voie de sortie 4'.

25 On peut souhaiter que la particule soit dirigée par le moyen de tri vers une voie de sortie munie d'un détecteur ou au contraire qu'elle emprunte une voie de sortie sans détecteur. Lorsque le dispositif possède un détecteur en amont et au moins
30 une voie de sortie sans détecteur, le tri de la particule est considéré comme réussi ou échoué en

déduisant sa trajectoire à partir des observations des voies de sortie munies de détecteur.

De façon préférentielle, un détecteur 8 est présent en amont du moyen de tri 10 lorsqu'au moins une des voies de sortie 4,4' n'est pas munie de détecteur. Si la particule est dirigée vers la voie de sortie sans détecteur, le détecteur en amont permet de mettre en évidence le passage de la particule dans le dispositif, par exemple à des fins de comptage.

Dans une autre configuration, le dispositif de tri ne dispose pas de détecteur en amont. Dans ce cas, une particule passant devant le moyen de tri 10 et ensuite orientée vers une voie de sortie sans détecteur ne produit aucun signal pendant son passage dans le dispositif de tri. Cette configuration peut être utilisée lorsque seules les particules orientées vers les voies de sortie munies de détecteur présentent un intérêt pour l'opération de tri.

Les figures 16a à 16d représentent un tri simplifié à deux voies de sortie, mais il peut aussi être appliqué à un plus grand nombre de voies de sortie. Si au moins deux voies de sortie ne possèdent pas de détecteur, ces voies de sortie ne peuvent pas être distinguées par la méthode décrite ici.

Nous décrirons par la suite le cas où le dispositif de tri est équipé uniquement de deux voies de sortie munies chacune d'un détecteur, mais le procédé de calibration s'applique à des dispositifs munis d'un nombre supérieur de voies de sortie, munies ou non d'un détecteur.

Les figures 17a à 17c représentent un procédé de calibration ou de recherche d'une force de déviation permettant le tri d'une population de particules vers une voie de sortie donnée. Dans cet exemple, on souhaite que les particules d'intérêt soient dirigées par le moyen de tri vers la voie de sortie 4 munie du détecteur 6. Les particules qui doivent être dirigées vers une autre voie de sortie ne sont pas concernées par cette opération de calibration.

10 Au début du réglage, le moyen de tri est actionné avec une force de déviation F choisie arbitrairement faible, comme le montre la figure 17a. On estime que la situation est celle décrite par les figures 15a et 15b, c'est-à-dire que la force de déviation est insuffisante. Le pic de détection p_2 sur le diagramme d_2 montre que la particule a emprunté la mauvaise voie de sortie 4'. Puis, l'amplitude de la force de déviation est augmentée d'une valeur arbitraire. La progression de la force F dépend du
15 moyen de tri employé. Généralement, l'amplitude ajoutée à F est comprise entre 10 % et 30 % de la valeur initiale de F . Après chaque progression, on observe la voie de sortie empruntée par la particule.

La figure 17b représente le cas où la
25 particule est à nouveau orientée vers la mauvaise voie de sortie et où il faut donc encore accroître la force F .

La figure 17c représente le cas où la force de déviation F est adéquate. Le pic de détection p_1 sur
30 le diagramme d_1 montre que la particule a emprunté la bonne voie de sortie 4 et donc que la force F est

convenable pour effectuer un tri vers cette voie de sortie.

La méthode peut également être appliquée en partant d'une force de déviation F choisie arbitrairement forte. On estime que la situation est celle décrite par les figures 15e et 15f, c'est-à-dire que la force de déviation est trop importante. La progression utilisée pour la recherche d'une force de déviation F consiste à retirer à F une fraction arbitraire de son amplitude, par exemple entre 10 % et 30 % de sa valeur initiale. Après chaque progression, on observe la voie de sortie empruntée par la particule. Cette opération s'arrête lorsque le pic de détection $p1$ sur le diagramme $d1$ montre que la particule a emprunté la bonne voie de sortie 4 et donc que la force F est convenable pour effectuer un tri vers cette voie de sortie.

Au début du réglage, le moyen de tri 10 est actionné avec une force de déviation choisie arbitrairement. Cette force F peut être faible ou forte selon le sens que l'on désire effectuer pour la progression. Si le tri de la particule est réussi dès l'origine avec cette force arbitraire, c'est-à-dire si le pic de détection $p1$ sur le diagramme $d1$ montre que la particule a emprunté la bonne voie de sortie 4 avec la force F choisie initialement, il n'est pas nécessaire d'appliquer la progression.

Le sens de la progression est choisi arbitrairement. Toutefois, il peut être nécessaire d'inverser le sens de la progression après un nombre prédéterminé de progressions si une force F permettant

le tri des particules n'a pas été trouvée en réduisant le pas de progression supplémentaire.

Il peut également être prévu de déterminer un intervalle de valeurs de F , représenté par les figures 18a à 18c, pour lesquelles la particule est déviée vers la bonne voie de sortie. Cette recherche sera appelée réglage fin. Les particules qui doivent être dirigées vers une autre voie de sortie ne sont pas concernées par cette opération de calibration.

Au début du réglage (Figure 18a), le pic de détection p_1 sur le diagramme d_1 montre que la particule a emprunté la bonne voie de sortie 4. La situation est celle décrite par les figures 15c et 15d, c'est-à-dire que la force de déviation du moyen de tri est appropriée. Puis, la force de déviation du moyen de tri est diminuée d'une valeur arbitraire. L'amplitude de la réduction de la force F dépend du moyen de tri employé. Généralement, l'amplitude retirée à F est comprise entre 3 % et 10 % de la valeur initiale de F . Après chaque réduction de la force de déviation, on observe la voie de sortie empruntée par la particule. La figure 18b représente le cas où la particule est toujours orientée vers la bonne voie de sortie. La force F peut donc être encore réduite. La figure 18c représente le cas où la force F n'est plus adéquate, car le pic de détection p_2 sur le diagramme d_2 montre que la particule a emprunté la mauvaise voie de sortie.

La méthode peut également être appliquée en augmentant la force de déviation F du moyen de tri, c'est-à-dire en ajoutant à la force F une fraction arbitraire de son amplitude, par exemple entre 3 % et

10 % de la valeur initiale de la force F . Après chaque progression, on observe la voie de sortie empruntée par la particule. Cette opération s'arrête lorsque le pic de détection p_2 sur le diagramme d_2 montre que la
5 particule a emprunté la mauvaise voie de sortie.

De façon préférentielle, l'opération de progression de F est effectuée successivement dans les deux sens de progression. Afin de déterminer les deux extrémités de l'intervalle des forces F possibles, une
10 progression est appliquée dans un sens jusqu'à ce que l'extrémité de l'intervalle de force soit connue, puis une progression est appliquée dans l'autre sens jusqu'à ce que l'autre extrémité de l'intervalle soit connue. Cet intervalle correspond aux forces de déviation qui
15 peuvent être exercées pour diriger un type donné de particules vers la voie de sortie adéquate.

L'organigramme de la figure 19 représente les différentes étapes du procédé de calibration d'un moyen de tri passif lorsque le fluide ne contient
20 qu'une seule population de particules.

Ce procédé permet de déterminer la force de déviation du moyen de tri pour diriger la population unique de particules vers la voie de sortie appropriée parmi plusieurs voies de sortie possibles. A chaque
25 étape de la calibration, les décisions peuvent être prises par l'opérateur, et/ou par un circuit électronique et/ou un logiciel, en particulier le choix de la force de déviation F dans l'intervalle de force identifié.

30 Dans un mode de réalisation automatique, le moyen de tri, les détecteurs amont et aval sont reliés

à un circuit électronique qui reçoit l'information des détecteurs et modifie les paramètres de fonctionnement du moyen de tri sur la base de ces informations. Le moyen de tri est actionné de manière continue. A
5 l'étape 100, la réussite ou l'échec de la déviation d'une particule est détecté par le détecteur en aval.

Si la particule a emprunté la bonne voie de sortie, la calibration reste inchangée.

En revanche, si la particule a emprunté une
10 voie de sortie erronée, une nouvelle calibration de la force de déviation F , représentée par la figure 17, est mise en œuvre (étape 102). Celle-ci peut être effectuée dès qu'un seul échec est observé ou après un nombre prédéterminé de tris incorrects.

15 Si un réglage fin de la force de déviation est décidé à l'étape 104, celui-ci est effectué au cours de l'étape 108. La précision à apporter dans le réglage de la force de déviation est définie par l'opérateur, et/ou le circuit électronique et/ou le
20 logiciel pilotant le moyen de tri. Le nombre de boucles de réglages fins peut être adapté pendant les réglages. Il peut également dépendre du moyen de tri employé pour l'opération de séparation.

Si un réglage fin n'est pas souhaité, la
25 calibration est terminée (étape 106).

Le procédé selon la présente invention prévoit également de modifier les réglages des paramètres de fonctionnement du dispositif de tri, lorsqu'il est constaté une dérive du moyen de tri ou
30 des conditions dans lesquelles il opère (par exemple, une variation de la vitesse des particules ou une

modification de la nature des particules). Les détecteurs placés dans les canaux de sortie permettent de détecter une telle dérive c'est-à-dire la présence de particules dans la mauvaise voie. Ceci sera décrit
5 plus avant dans la description.

A l'étape 110, on vérifie si le réglage fin de la force de déviation a abouti. Si oui, on retourne à l'étape 104. Sinon, on retourne à l'étape 102 de recherche de la force de déviation.

10 Les organigrammes des figures 20 et 21 représentent les différentes étapes du procédé de calibration d'un moyen de tri passif dans le cas où le fluide contient plusieurs populations de particules d'intérêt. La force de déviation du moyen de tri est
15 alors calibrée pour chaque population de particules, afin que chaque type de particule soit dirigé vers la voie de sortie appropriée. Dans un dispositif de tri passif, la force F appliquée par le moyen de tri est identique pour toutes les particules, une force de
20 déviation commune à l'ensemble des intervalles de force est alors sélectionnée.

Dans un dispositif de tri actif, on peut prévoir de modifier la force de déviation en fonction des particules détectées à l'entrée du canal 2.

25 Le procédé représenté par la figure 20 identifie un intervalle de force pour chaque population de particules. Cette recherche est effectuée successivement pour chaque population. En cas de dérive, une nouvelle recherche de la force de déviation
30 F est effectuée pour la population concernée, et si nécessaire pour l'ensemble des particules. Une fois que

les intervalles de force ont été identifiés pour toutes les populations de particules, une force de déviation F est choisie parmi l'intersection des différents intervalles de force.

5 Le moyen de tri est actionné de manière continue. A l'étape 200, la réussite ou l'échec de la déviation d'une particule est détecté par le détecteur en aval

10 Si la particule a emprunté la bonne voie de sortie, la calibration reste inchangée. On poursuit la vérification de la réussite de la déviation.

 En revanche, si la particule a emprunté une voie de sortie erronée, une nouvelle calibration de la force de déviation F est mise en œuvre (étape 202).
15 Celle-ci peut être effectuée dès qu'un seul échec est observé ou après un nombre prédéterminé de tris incorrects.

 A l'étape 204, lorsque cette force de déviation a été trouvée, on recherche un intervalle de
20 valeur de F apte à dévier correctement la première population de particules

 A l'étape 206, si le réglage n'a pas abouti, on retourne à l'étape 202.

 Si la détermination de l'intervalle est une
25 réussite, on passe à l'étape 208, lors de laquelle on recherche une force de déviation apte à dévier correctement les particules de la deuxième population. Un indice i prend la valeur 2.

 A l'étape 210, on recherche un intervalle
30 de valeur de F apte à dévier correctement la deuxième population de particules

Puis à l'étape 212, si cette détermination échoue, on retourne à l'étape 208, sinon on passe à l'étape 214.

5 A l'étape 214, on vérifie s'il existe une troisième population de particules d'intérêt.

Le nombre de populations d'intérêt est généralement connu avant le tri par l'opérateur, puisque celui-ci désire extraire du fluide en circulation certains types prédéterminés de particules.

10 Dans le cas où le nombre de populations n'est pas connu, il peut être déterminé par une opération de cytométrie en flux à l'aide d'un dispositif extérieur, ou avec le détecteur en amont 8, ou avec les détecteurs en aval 6, 6'.

15 S'il existe une autre population, l'indice i est incrémenté de 1 et on retourne à l'étape 208.

S'il n'existe pas d'autre population, on choisit à l'étape 216 une valeur de la force de déviation commune aux deux intervalles précédemment
20 déterminés aux étapes 204,210.

A l'étape 218, la calibration se termine.

Comme précédemment, le procédé selon la présente invention peut prévoir également de modifier les réglages des paramètres de fonctionnement du
25 dispositif de tri, lorsqu'il est constaté une dérive du moyen de tri ou des conditions dans lesquelles il opère (par exemple, une variation de la vitesse des particules ou une modification de la nature des particules). Les détecteurs placés dans les canaux de
30 sortie permettent de détecter une telle dérive,

c'est-à-dire la présence de particules dans la mauvaise voie. Ceci sera décrit plus avant dans la description.

Ainsi le procédé décrit en relation avec l'organigramme 20, peut être appliqué en permanence pendant tout le tri, et non uniquement préalablement au tri.

Dans le cas d'un dispositif de tri actif, il n'est pas nécessaire de déterminer une valeur commune pour la force de déviation (étape 216), mais une valeur de force de déviation particulière peut être déterminée pour chacune des populations. Le réglage du moyen de tri est alors adapté à chaque particules.

Les étapes du procédé représentées sur l'organigramme de la figure 21 permettent également de déterminer une force de déviation commune pour plusieurs populations de particules. Pour cela, ce procédé prévoit de rétrécir l'intervalle de force en analysant successivement la trajectoire de chaque population de particules. Tout d'abord, un intervalle de force est identifié pour une première population de particules, les autres populations étant ignorées pendant cette opération de calibration. Puis, la trajectoire suivie par la deuxième population de particules est également observée. On fait varier la force de déviation dans le premier intervalle de force depuis une de ses extrémités, jusqu'à ce que la force F permette également de diriger la deuxième population de particules vers la voie de sortie correspondante. Puis, l'intervalle de force pour la deuxième population est recherché par modification de la force F et identifiée dans les limites du premier intervalle de force. Seule

la partie commune aux deux intervalles de force est conservée. Cette opération est réalisée pour chaque population de particules, ce qui permet de réduire à chaque fois la largeur de l'intervalle de forces.

5 Finalement, une force de déviation F est choisie dans l'intervalle de forces final.

La première phase 300.1 regroupant les étapes 300, 302, 304 et 306 est identique à la première l'étape 200.1 du procédé de la figure 20.

10 Lorsque l'intervalle I de force pour la première population a été déterminé, on passe à l'étape 308, un indice i prend la valeur 2. On recherche alors une force apte à dévier avec succès les particules de la deuxième population à l'intérieur de l'intervalle I .

15 Lorsque cette force a été trouvée au cours de l'étape 308, on détermine à l'étape 310 un intervalle de valeurs II pour la deuxième population à l'intérieur de l'intervalle I .

20 A l'étape 310, on vérifie si cet intervalle II a été trouvé.

Si l'intervalle II n'a pas été trouvé, on retourne à l'étape 308. Si la détermination de l'intervalle II échoue un nombre prédéterminé de fois, on retourne à l'étape 302, lors de laquelle on détermine une force de déviation pour la première population.

Si la détermination de l'intervalle II a réussi, on passe à l'étape 314, dans laquelle on vérifie s'il existe une autre population d'intérêt.

30 Si c'est le cas, i est incrémenté de 1 et on retourne à l'étape 308.

Sinon on passe à l'étape 316, dans laquelle on choisit une valeur de F dans l'intervalle final, qui correspond lorsque le flux comprend deux populations, à l'intervalle II.

5 Puis la calibration se termine à l'étape 320.

Comme pour les procédés représentés par les organigrammes 19 et 20, on peut prévoir une autocalibration en continu du dispositif de tri, en appliquant en permanence pendant toute la durée du tri les étapes 300 à 320 précédemment décrite, de manière à corriger les dérives du dispositif.

Le procédé de calibrage selon l'invention peut prévoir de régler également la durée d'application de la force de déviation.

Le réglage s'effectue de la même manière que pour la force de déviation, ainsi le déroulement des procédés représentés par les organigrammes des figures 19, 20 et 21 s'appliquent de manière similaire.

20 Le procédé de calibration selon la présente invention peut également comprendre l'étape de réglage d'au moins un autre paramètre de fonctionnement tel que, le temps écoulé entre le moment de la détection par le détecteur en amont du moyen de tri de la ou des particules d'intérêt et le moment où la ou les particules atteignent le moyen de tri, appelé durée avant déclenchement.

La figure 5a montre un chronogramme type, dans lequel :

30 - le signal d0 représente le signal mesuré par le détecteur 8 en amont,

- mt représente la force appliquée sur le moyen de tri 10,

- d1 est le signal mesuré par le détecteur en aval 6 dans la voie de sortie 4,

5 - d2 est le signal mesuré par le détecteur en aval 6' dans la voie de sortie 4'.

Les pics de détection p0, p1, p2 sur les diagrammes d0, d1 ou d2 représentent le passage d'une particule devant les détecteurs 8, 6, 6' du dispositif
10 de la figure 5b respectivement.

Lorsque la particule est déviée par le moyen de tri 10 vers une certaine voie de sortie, elle produit un pic de détection devant le détecteur de cette voie de sortie uniquement. Sur les chronogrammes,
15 l'amplitude du pic de détection est arbitraire, tandis que la largeur du pic de détection indique le temps de présence de la particule devant le détecteur. La forme des pics de détection est simplifiée par un signal en créneau, mais la forme réelle du signal de détection
20 peut éventuellement apporter des informations sur la particule selon le type de détecteur employé.

La base du signal mt, c'est-à-dire la force appliquée lorsque le moyen de tri 10 est au repos, peut correspondre à une force de déviation nulle ou non
25 nulle, selon le moyen de tri employé. La base des signaux d0, d1 et d2 peut correspondre à un signal mesuré nul ou non nul, selon les détecteurs employés et l'environnement dans lequel ils sont utilisés.

Le fonctionnement du moyen de tri est
30 caractérisé par trois paramètres :

- la durée de temps t_A représente la durée avant le déclenchement du moyen de tri. Cette durée est prise arbitrairement depuis le début du pic de détection p_0 du signal d_0 jusqu'au début du déclenchement du moyen de tri 10,

- la durée de temps t_B représente la durée de l'actionnement ou durée d'impulsion du moyen de tri 10,

- la hauteur F représente l'amplitude de la force de déviation du moyen de tri 10.

La durée avant le déclenchement du moyen de tri et la durée de l'actionnement peuvent être identiques pour toutes les particules. Le tri vers les différentes voies de sortie est alors obtenu grâce à une modulation de la force de déviation. Toutefois, la durée avant déclenchement t_A et/ou la durée de l'actionnement t_B peuvent également être spécifiques, par exemple dans le cas où plusieurs sous-populations de particules sont concernées. Dans ce cas, une durée t_A et/ou une durée t_B spécifiques sont recherchées et appliquées pour chaque voie de sortie. L'analyse en flux de chaque particule à partir du pic de détection sur le diagramme d_0 permet d'appliquer pour chaque particule les paramètres appropriés pour t_A et/ou t_B et/ou F .

Le nombre de voies de sortie n'est pas limité, comme le montre le chronogramme de la figure 5c associé au dispositif de la figure 5d : il y a autant de signaux que de voies de sortie possibles pour les particules. Par la suite, nous décrirons le cas où le dispositif de tri est équipé de deux voies de sortie,

mais le procédé selon la présente invention s'applique aux dispositifs munis d'un nombre supérieur de voies de sortie.

Les dispositifs des figures 6b, 6d, 6f comportent un détecteur 8 dans le canal d'entrée 2, et un détecteur 6, 6' dans chaque canal de sortie 4, 4'. Les figures 6a à 6f montrent comment la lecture des signaux des détecteurs en aval renseigne sur la réussite ou l'échec du tri de la particule. Dans cet exemple, on souhaite que la particule soit dirigée par le moyen de tri vers la voie de sortie 4 munie du détecteur 6.

Trois cas sont représentés :

- le chronogramme de la figure 6a, associé au dispositif de la figure 6b représente le cas où le moyen de tri 10 est déclenché trop tôt. Le pic de détection p2 sur le diagramme d2 montre que la particule a emprunté la mauvaise voie de sortie 4',

- le chronogramme de la figure 6c, associé au dispositif de la figure 6d représente le cas où le moyen de tri est déclenché à un moment approprié. Le tri de la particule est réussi, car le pic de détection p1 sur le diagramme d1 montre que la particule a emprunté la bonne voie de sortie 4,

- le chronogramme de la figure 6e, associé au dispositif de la figure 6f représente le cas où le moyen de tri est déclenché trop tard, la force de déviation a donc été appliquée trop tardivement pour pouvoir modifier la trajectoire de la particule d'intérêt. Le pic de détection p2 sur le diagramme d2

montre que la particule a emprunté la mauvaise voie de sortie 4'.

Les figures 7a à 7d montrent le fonctionnement d'un dispositif dont la voie de sortie 4' ne dispose pas de détecteur. La direction prise par la particule est déduite par la présence ou l'absence d'un pic de détection dans les voies de sortie munies de détecteur.

Deux cas sont représentés :

- 10 - sur le chronogramme de la Figure 7a, associé au dispositif de la figure 7b, le pic de détection p1 sur le diagramme d1 montre que la particule a emprunté la voie de sortie 4,
- 15 - sur le chronogramme de la figure 7c, associé au dispositif de la figure 7d, l'absence de pic de détection sur le diagramme d1 montre que la particule a emprunté la voie de sortie 4'.

On peut souhaiter que la particule soit dirigée par le moyen de tri vers une voie de sortie munie d'un détecteur ou au contraire qu'elle emprunte une voie de sortie sans détecteur. Lorsque le dispositif possède au moins une voie de sortie sans détecteur, le tri de la particule est considéré comme réussi ou échoué en déduisant sa trajectoire à partir des observations des voies de sortie munies de détecteur.

Les figures 7a à 7d représentent un tri simplifié à deux voies de sortie, mais il peut aussi être appliqué à un plus grand nombre de voies de sortie. Si au moins deux voies de sortie ne possèdent pas de détecteur, ces voies de sortie ne peuvent pas

être distinguées par le procédé décrit ici, bien qu'elles puissent être différenciées en pratique si les paramètres de fonctionnement du moyen de tri diffèrent pour ces voies de sortie.

5 Nous décrirons par la suite le cas où le dispositif de tri est équipé uniquement de deux voies de sortie munies chacune d'un détecteur, mais le procédé selon la présente invention s'applique de manière similaire à des dispositifs munis d'un nombre
10 supérieur de voies de sortie.

 L'organigramme de la figure 13 représente les étapes d'un procédé de calibrage selon la présente invention d'un moyen de tri actif. Il permet de déterminer, pour une voie de sortie donnée et pour un
15 type donné de particules, les paramètres de fonctionnement du moyen de tri. Dans un processus normal de calibration, le protocole de la figure 13 est appliqué pour chaque voie de sortie et/ou pour chaque type de particules en suspension.

20 A chaque étape, les décisions peuvent être prises par l'opérateur, et/ou par le circuit électronique et/ou le logiciel, telles que la règle pour le choix de la durée d'actionnement t_B et/ou de la force de déviation F et/ou de la durée avant
25 déclenchement t_A dans les intervalles de temps et/ou de force identifiés.

 Le moyen de tri est déclenché lors du passage d'une particule. La réussite ou l'échec de la déviation est détecté par le détecteur en aval à
30 l'étape 400.

Si la particule a emprunté la bonne voie de sortie, la calibration reste inchangée. La calibration se termine, ou on poursuit la vérification de la réussite de la déviation.

5 En revanche, si la particule a emprunté une voie de sortie erronée, une nouvelle calibration peut être mise en œuvre, on passe à une étape 402. La calibration peut être effectuée dès qu'un seul échec est observé ou après un nombre prédéterminé de tris
10 incorrects, un compteur peut alors être prévu.

A l'étape 402, il est déterminé une durée avant déclenchement t_A . Celle-ci peut être obtenue par le calcul de la vitesse d'une ou de plusieurs particules, représenté par la figure 8, et/ou par la
15 méthode de progression de t_A , représentée par la figure 9.

Afin de déterminer le temps t_A , on peut déterminer la vitesse de déplacement de la particule d'intérêt. Pour cela on mesure le temps nécessaire
20 écoulé entre la détection de la particule par le détecteur 8 en amont et la détection par un des détecteurs en aval 6, 6'. Connaissant la distance entre les détecteurs en amont et en aval, on en déduit V . A partir de V , on détermine alors le temps que la
25 particule mettra pour atteindre le moyen de tri 10.

Les figures 8a à 8c représentent trois méthodes pour obtenir une estimation de la vitesse moyenne des particules devant le moyen de tri 10. Ce calcul de la vitesse des particules permet de donner
30 une première évaluation de la durée avant déclenchement t_A du moyen de tri.

Dans la méthode présentée par la figure 8a, le moyen de tri 10 est arrêté et bloqué. Une ou plusieurs particules sont détectées par le détecteur 8 puis par un des détecteurs 6, 6' en aval. Le temps
5 séparant les deux détections de la particule permet de calculer sa vitesse V et d'en déduire une valeur approximative de la durée avant déclenchement t_A .

La vitesse V des particules est calibrée au début de l'utilisation du dispositif, mais elle peut
10 également être mesurée pour chaque particule pendant l'opération de tri de manière à réaliser avantageusement un autocalibrage et une correction du temps t_A si une dérive survenait. Le calcul de la vitesse de chaque particule permet en particulier de
15 contrôler l'absence de dérive de la vitesse des particules lors de l'utilisation du dispositif.

Dans la méthode représentée par la figure 8b, qui est appliquée lors de l'opération normale de séparation, le moyen de tri 10 est actionné au passage
20 de la particule. Indépendamment de la réussite ou de l'échec du tri de la particule, sa vitesse est mesurée et comparée à la vitesse attendue. En cas de différence importante ou en cas de dérive de la vitesse pour un nombre prédéterminé de particules, il peut être décidé
25 de réaliser un nouveau paramétrage de la durée avant déclenchement t_A .

La troisième méthode de calcul, représentée par la figure 8c, utilise la largeur du pic de détection. Le moyen de tri 10 peut être actionné ou non
30 lors du passage de la particule. La mesure de la vitesse est effectuée avec le pic de détection sur le

détecteur 8 et/ou avec le pic de détection sur un détecteur 6, 6' en aval. Le calcul de la vitesse de la particule consiste à diviser la distance parcourue par la particule entre le début et la fin du pic, par la durée du pic utilisé. Si la distance parcourue par la particule avant le déclenchement est connue avec précision, le rapport de cette distance et de la durée du pic permet d'estimer la vitesse V et d'évaluer la durée avant déclenchement t_A .

Pour qu'elle puisse donner des valeurs significatives, cette méthode peut nécessiter une grande résolution dans la mesure de la largeur du pic de détection et dans celle de la distance parcourue par la particule devant le détecteur.

Si la vitesse V de la particule est constante entre le détecteur en amont 8 et le détecteur 6,6' en aval, l'estimation de la durée avant déclenchement t_A est obtenue de manière simple par un produit en croix : la durée nécessaire à la particule pour effectuer le trajet entre le détecteur en amont et le moyen de tri est déduite en transposant la vitesse V de la particule sur la distance entre le détecteur en amont et la position du moyen de tri.

En revanche, si la vitesse V de la particule n'est pas constante entre le détecteur en amont et le détecteur en aval, un calcul plus complexe est employé pour estimer la vitesse de la particule entre le détecteur en amont et le moyen de tri. En particulier, cette correction est nécessaire si le débit du fluide transportant la particule est différent dans la voie d'entrée et dans la voie de sortie.

Une méthode alternative pour obtenir une durée avant déclenchement t_A est représentée par les figures 9a à 9d. Dans cet exemple, on souhaite que les particules d'intérêt soient dirigées par le moyen de tri vers la voie de sortie 4 munie du détecteur 6. Les
5 particules qui doivent être dirigées vers une autre voie de sortie ne sont pas concernées par cette opération de calibration.

Le moyen de tri 10 est actionné avec une
10 force de déviation F et une durée d'impulsion t_B choisies arbitrairement. L'amplitude de la force F et la durée d'impulsion t_B sont des valeurs prédéterminées par l'opérateur et/ou le circuit électronique et/ou le logiciel, ou des valeurs issues d'un calibrage
15 précédent, ou des valeurs déterminées de la manière décrite précédemment (organigrammes 19, 20, 21). La force F et la durée t_B restent constantes pendant le réglage de t_A .

Au début du réglage, le moyen de tri 10 est
20 actionné avec une durée avant déclenchement t_A choisie arbitrairement courte, comme le montre la figure 9a. On estime que la situation est décrite par les figures 6a et 6b, c'est-à-dire que le moyen de tri 10 est déclenché trop tôt. Le pic de détection p_2 sur le
25 diagramme d_2 montre que la particule a emprunté la mauvaise voie de sortie 4'.

Puis, le moment du déclenchement du moyen de tri est déplacé en ajoutant une partie de la durée de l'actionnement t_B à la durée avant déclenchement t_A .
30 La progression de t_A est choisie arbitrairement et dépend du type de moyen de tri 10 employé. Par

exemple, t_A peut être décalée d'une durée $0,5 * t_B$. Généralement, la durée ajoutée à t_A est comprise entre $0,3 * t_B$ et $0,7 * t_B$. Après chaque progression, on observe la voie de sortie empruntée par la particule.

5 Les figures 9b et 9c représentent le cas où la particule est à nouveau orientée vers la mauvaise voie de sortie 4' et où il faut donc encore accroître la durée t_A .

La figure 9d représente le cas où la durée avant déclenchement t_A est adéquate pour la durée d'actionnement t_B et la force de déviation F appliquées. Le pic de détection p_1 sur le diagramme d_1 montre que la particule a emprunté la bonne voie de sortie 4 et donc que la durée t_A est convenable pour
10 effectuer un tri vers cette voie de sortie 4.

Le procédé de calibrage peut également être appliqué en partant d'une durée avant déclenchement t_A choisie arbitrairement longue. On estime que la situation est celle décrite par les figures 6e et 6f,
20 c'est-à-dire que le moyen de tri est déclenché trop tard. La progression utilisée pour la recherche d'une durée avant déclenchement t_A prévoit de retirer à t_A une fraction arbitraire de la durée t_B , par exemple une durée comprise entre $0,3 * t_B$ et $0,7 * t_B$. Après chaque
25 progression, on observe la voie de sortie empruntée par la particule. Cette opération s'arrête lorsque le pic de détection p_1 sur le diagramme d_1 montre que la particule a emprunté la bonne voie 4 de sortie, donc que la durée t_A est convenable pour effectuer un tri
30 vers cette voie de sortie 4.

Au début du réglage, le moyen de tri est actionné avec une durée avant déclenchement t_A choisie arbitrairement. Cette durée t_A peut être courte ou longue selon le sens que l'on désire effectuer pour la progression. Si le tri de la particule est réussi dès l'origine avec cette durée arbitraire, c'est-à-dire si le pic de détection p_1 sur le diagramme d_1 montre que la particule a emprunté la bonne voie de sortie 4 avec la durée t_A choisie initialement, il n'est pas nécessaire d'appliquer la progression.

La recherche de t_A par l'opération de progression est appliquée comme méthode alternative ou comme méthode complémentaire au calcul de t_A par la mesure de la vitesse des particules. Le choix d'une durée t_A initiale peut être effectué après une première estimation de t_A obtenue à partir du calcul de la vitesse moyenne des particules. La valeur de t_A obtenue par calcul peut être le point de départ pour l'opération de progression.

Le sens de la progression est choisi arbitrairement, mais une inversion du sens de la progression peut être nécessaire après un nombre prédéterminé de progressions si une durée t_A permettant le tri des particules n'a pas été trouvée. Une autre possibilité est de décaler arbitrairement la valeur de t_A issue du calcul de la vitesse pour obtenir la durée t_A initiale pour l'opération de progression. Le décalage peut être effectué au choix vers une durée t_A plus courte ou plus longue que la durée t_A issue du calcul de la vitesse.

A l'étape 404, on vérifie si t_A a été déterminée.

En cas d'échec dans la recherche d'une durée avant déclenchement t_A , la progression de la durée t_A est mise en oeuvre sur un plus grand intervalle de temps (Etape 404.1). Si cette solution est insatisfaisante, la durée d'actionnement t_B et/ou la force de déviation F sont modifiées (Etape 404.2). La durée t_A fait alors l'objet d'une nouvelle recherche.

En cas de réussite dans la recherche d'une durée avant déclenchement t_A , on passe à l'étape 406 dans laquelle un réglage fin de la durée t_A , peut être effectué. La précision qui doit être apportée dans les réglages des paramètres du moyen de tri est définie par l'opérateur, et/ou le circuit électronique et/ou le logiciel pilotant le moyen de tri. Le nombre de boucles de réglage fin peut être adapté pendant les réglages. Il peut également dépendre du moyen de tri employé pour l'opération de séparation.

Le procédé de détermination du réglage fin de la durée avant déclenchement t_A est expliqué à l'aide des figures 10a à 10d. Ce réglage fin est utilisé pour déterminer l'intervalle de valeurs de t_A pour lesquelles les particules sont dirigées correctement vers la voie de sortie 4 munie du détecteur 6, puis pour choisir une durée t_A dans cet intervalle. La force F et la durée t_B restent constantes pendant le réglage de t_A . Les particules qui doivent être dirigées vers l'autre voie de sortie 4' ne sont pas concernées par cette opération de calibration.

Au début du réglage (Figure 10a), le pic de détection p1 sur le diagramme d1 montre que la particule a emprunté la bonne voie de sortie 4. La situation est celle décrite par les figures 6c et 6d, c'est-à-dire que le moyen de tri est actionné avec une durée avant déclenchement tA appropriée.

Puis, le moment du déclenchement du moyen de tri est déplacé en ajoutant une partie de la durée de l'actionnement tB à la durée avant déclenchement tA. La progression de tA est choisie arbitrairement et dépend du type de moyen de tri employé. Par exemple, tA peut être décalée d'une durée $0,2 * tB$. Généralement, la durée ajoutée tA est comprise entre $0,1 * tB$ et $0,3 * tB$. Après chaque progression, on observe la voie de sortie empruntée par la particule.

Les figures 10b et 10c représentent le cas où la particule est toujours orientée vers la bonne voie de sortie 4. La durée tA peut donc être encore augmentée. La figure 10d représente le cas où la durée avant déclenchement tA n'est plus adéquate, car le pic de détection p2 sur le diagramme d2 montre que la particule a emprunté la mauvaise voie de sortie 4'. L'intervalle possible des durées tA est alors connu, pour la durée d'actionnement tB et la force de déviation F appliquées.

L'intervalle complet des durées avant déclenchement tA possibles est connu, car l'autre extrémité de l'intervalle (tA minimale) a été déterminée au cours de l'étape 402. Si nécessaire, la valeur basse de l'intervalle est déterminée avec une

meilleure précision en appliquant le sens de la progression vers les valeurs de t_A décroissantes.

Une durée t_A comprise dans cet intervalle peut alors être choisie arbitrairement, par exemple la
5 valeur centrale de cet intervalle. Le choix d'une durée t_A près du centre de l'intervalle de temps possible peut être motivé par l'existence d'une variabilité dans la vitesse des particules. La durée t_A au centre de l'intervalle de temps apparaît comme la plus appropriée
10 pour effectuer un tri vers une voie de sortie, car la largeur de l'intervalle de temps correspond à la durée pendant laquelle la présence de la particule devant le moyen de tri est certaine.

La méthode peut également être appliquée en
15 déplaçant le moment du déclenchement du moyen de tri dans le sens contraire, c'est-à-dire en retirant à t_A une fraction arbitraire de la durée t_B , par exemple une durée comprise entre $0,1 * t_B$ et $0,3 * t_B$. Après chaque progression, on observe la voie de sortie empruntée par
20 la particule. Cette opération s'arrête lorsque le pic de détection sur le diagramme d_2 montre que la particule a emprunté la mauvaise voie de sortie. Il est également possible d'appliquer une progression dans un sens jusqu'à ce que l'extrémité de l'intervalle soit
25 connue, puis d'appliquer une progression dans l'autre sens jusqu'à ce que l'autre extrémité de l'intervalle soit connue. Une fois que l'intervalle de temps a été identifié, une durée t_A comprise dans cet intervalle peut être choisie arbitrairement.

30 A l'étape 410, on vérifie si un réglage fin de t_A a été trouvé.

Si cette détermination a échoué, par exemple en cas de dérive du moyen de tri ou des conditions dans lesquelles il opère (dérive due, par exemple, à une variation de la vitesse des particules ou à une modification de la nature des particules) pendant la calibration du moyen de tri, il est possible que les réglages fins des paramètres de fonctionnement du moyen de tri ne puissent pas aboutir. On retourne alors à l'étape 402 et une nouvelle recherche de la durée avant déclenchement t_A est alors effectuée.

Si un réglage fin de t_A a été trouvé, on passe à l'étape 412, dans laquelle on choisit ou non d'effectuer un réglage fin de t_B . Si la réponse est non, on passe à l'étape 418. Si la réponse est oui on passe à l'étape 414 de détermination de ce réglage.

La méthode de réglage fin de la durée d'actionnement t_B , expliquée grâce aux figures 11a à 11f, est utilisée pour déterminer l'intervalle de valeurs de t_B pour lesquelles les particules sont dirigées correctement vers la voie de sortie 4 munie du détecteur 6, puis pour choisir une durée t_B dans cet intervalle. La force F reste constante pendant le réglage de t_B . Les particules qui doivent être dirigées vers une autre voie de sortie ne sont pas concernées par cette opération de calibration.

Au début du réglage (Figure 11a), le pic de détection p_1 sur le diagramme d_1 montre que la particule a emprunté la bonne voie de sortie 4. La situation est celle décrite par les figures 6c et 6d, c'est-à-dire que le moyen de tri 10 est actionné avec une durée d'actionnement t_B appropriée. Puis, la durée

d'actionnement du moyen de tri 10 est réduite d'une valeur arbitraire qui dépend du type de moyen de tri 10 employé. Par exemple, la fin de la durée t_B peut être réduite d'une période de temps de $0,2 * t_B$.

5 Généralement, la durée retirée à t_B représente 0,1 à 0,3 fois la valeur initiale de t_B . Après chaque réduction de la durée t_B , on observe la voie de sortie empruntée par la particule.

La figure 11b représente le cas où la
10 particule est toujours orientée vers la bonne voie de sortie 4. La durée t_B peut donc être encore réduite.

La figure 11c représente le cas où la durée de l'actionnement t_B n'est plus adéquate, car le pic de détection p_2 sur le diagramme d_2 montre que la
15 particule a emprunté la mauvaise voie de sortie 4'.

De cette manière, une partie inférieure de l'intervalle des durées t_B est déterminée.

Il peut s'avérer inutile de rechercher la partie supérieure de l'intervalle des durées t_B , car il
20 est préférable d'avoir une durée t_B faible plutôt qu'une durée t_B élevée dans une application de tri de particules. En effet, il est préférable que l'actionnement du moyen de tri 10 soit terminé avant l'arrivée de la particule suivante. Toutefois, il peut
25 être avantageux de rechercher et de choisir une durée t_B plus longue que sa valeur initiale si une trop faible valeur de t_B aboutit à un nombre inacceptable de tris échoués. Dans ce cas, la durée t_B est augmentée de manière progressive d'une valeur arbitraire. Par
30 exemple, la fin de la durée t_B peut être augmentée d'une période de temps comprise entre 0,1 et 0,3 fois

la valeur initiale de t_B . Après chaque augmentation de la durée t_B , on observe la voie de sortie empruntée par la particule. Si celle-ci est toujours orientée vers la bonne voie de sortie 4, on peut soit augmenter encore
5 la durée t_B , soit décider que l'augmentation de t_B est suffisante. Cette décision peut être prise par l'opérateur, et/ou par le circuit électronique, et/ou le logiciel pilotant le moyen de tri. En revanche, si la particule a emprunté la mauvaise voie 4', on estime
10 que la valeur supérieure de t_B a été dépassée.

L'intervalle possible des durées t_B est alors connu, pour la force de déviation F appliquée. Une durée t_B comprise dans cet intervalle peut alors être choisie arbitrairement. En particulier, la durée
15 t_B peut être suffisamment large pour que, en dépit d'une éventuelle variation dans la vitesse des particules, le moyen de tri soit toujours actionné lors du passage d'une particule.

Le réglage fin de la durée t_B peut être
20 effectué de différentes manières.

Les figures 11a à 11c montrent le cas où la fin de la durée d'impulsion t_B est réduite. Dans une autre configuration, la fin de la durée d'actionnement t_B est inchangée, tandis que le début de la durée
25 d'actionnement t_B est réduit.

Les figures 11d à 11f montrent une autre possibilité pour réduire la durée t_B . Dans cette configuration, le début et la fin de la durée d'impulsion t_B sont réduits simultanément. Cette
30 réduction de t_B peut être symétrique ou asymétrique autour de la valeur centrale de t_B .

La figure 11e représente le cas où la particule est toujours orientée vers la bonne voie de sortie 4 tandis que la figure 11f représente le cas où la durée de l'actionnement t_B n'est plus adéquate.

5 L'intervalle possible des durées t_B étant alors connu, pour la force de déviation F appliquée, la durée t_B comprise dans cet intervalle est choisie arbitrairement.

Si un tri des particules d'intérêt ne peut
10 pas être obtenu par réduction de la durée t_B ou si le tri des particules est instable, la durée d'actionnement du moyen de tri peut être augmentée de manière similaire, c'est-à-dire en augmentant le début et/ou la fin de la durée d'impulsion t_B .

15 Une possibilité pour la durée d'actionnement t_B est de la rendre égale à la largeur de l'intervalle de temps défini précédemment pour la durée t_A . La présence de la particule devant le moyen de tri est certaine si la durée t_A est divisée par 2
20 tandis que la durée t_B reste constante, c'est-à-dire si la durée t_B devient très grande devant la durée t_A .

A l'étape 416, on vérifie si ce réglage a réussi. Si c'est le cas, on passe à l'étape 418.

Si c'est un échec, on retourne à l'étape
25 402.

Si on choisit à l'étape 418 d'effectuer un réglage fin de la force de déviation, on passe à l'étape 420 de réglage de cette force.

La méthode de réglage fin de la force de
30 déviation F , expliquée grâce aux figures 12a à 12c, est utilisée pour déterminer l'intervalle de valeurs de la

force de déviation pour laquelle les particules sont dirigées correctement vers la voie de sortie 4 munie du détecteur 6, puis pour choisir une force F dans cet intervalle. La durée avant déclenchement t_A et la durée d'actionnement t_B restent constantes pendant le réglage de F . Les particules qui doivent être dirigées vers une autre voie de sortie ne sont pas concernées par cette opération de calibration.

Au début du réglage, le pic de détection p_1 sur le diagramme d_1 montre que la particule a emprunté la bonne voie de sortie 4 (Figure 12a). La situation est celle décrite par les figures 6c et 6d, c'est-à-dire que le moyen de tri est actionné avec une force F appropriée. Puis, la force de déviation du moyen de tri est réduite d'une valeur arbitraire. L'amplitude de la réduction de la force F dépend du type de moyen de tri employé. Par exemple, l'amplitude de la force F peut être réduite de 20 %. Généralement, l'amplitude retirée à F est de 10 % à 30 % de la valeur initiale de F . Après chaque réduction de la force de déviation, on observe la voie de sortie empruntée par la particule. La figure 12b représente le cas où la particule est toujours orientée vers la bonne voie de sortie 4. La force F peut donc être encore réduite. La figure 12c représente le cas où la force F n'est plus adéquate, car le pic de détection p_2 sur le diagramme d_2 montre que la particule a emprunté la mauvaise voie de sortie 4'. Une force F comprise dans cette portion de l'intervalle de valeurs de la force de déviation peut alors être choisie arbitrairement

La méthode peut également être appliquée en augmentant la force de déviation du moyen de tri, par exemple d'une amplitude comprise entre 10 % et 30 % de la valeur initiale. Après chaque augmentation de la force F , on observe la voie de sortie empruntée par la particule. Cette opération s'arrête lorsque le pic de détection p_2 sur le diagramme d_2 montre que la particule a emprunté la mauvaise voie de sortie 4'. Une force F comprise dans cette portion de l'intervalle de valeurs de la force de déviation peut alors être choisie arbitrairement.

Afin d'obtenir l'intervalle entier des valeurs de la force de déviation adaptée à dévier correctement la particule, on peut regrouper les deux intervalles déterminés précédemment.

Il est également possible d'augmenter la force F jusqu'à ce que l'extrémité de l'intervalle soit connue, puis de diminuer la force F jusqu'à ce que l'autre extrémité de l'intervalle soit connue. L'intervalle complet des forces possibles est alors connu, pour la durée avant déclenchement t_A et la durée d'actionnement t_B appliquées. Une force de déviation F comprise dans cet intervalle peut alors être choisie arbitrairement.

A l'étape 422, on vérifie si le réglage a abouti. Si oui, on passe à l'étape 424.

Si c'est un échec, on retourne à l'étape 402.

Si à l'étape 418, on choisit de ne pas faire le réglage fin de la force de déviation, on passe à l'étape 424.

A l'étape 424, on demande si on veut effectuer un réglage d'un des paramètres t_A , t_B ou force de déviation.

Si on souhaite un tel réglage, on retourne
5 à l'étape 406 ; sinon on passe à l'étape 426 qui termine la calibration.

On peut appliquer le procédé représenté en figure 13, pour déterminer la force de déviation ou de la durée d'actionnement, puis effectuer ou ne pas
10 effectuer des réglages fins pour les autres paramètres.

Les différentes étapes de réglage des paramètres de fonctionnement peuvent être combinées.

La présente invention prévoit également de pouvoir modifier les paramètres de fonctionnement du
15 dispositif de tri lors de son fonctionnement.

En effet, lors du fonctionnement du dispositif de tri, une dérive du moyen de tri 10 peut subvenir, ou les conditions dans lesquelles le moyen de tri opère peuvent changer (telles que par exemple, une
20 variation de la vitesse des particules ou une modification de la nature des particules). La force de déviation et/ou la durée d'impulsion t_B et/ou la durée avant déclenchement t_A peuvent ne plus être adaptées pour modifier correctement la trajectoire de la ou des
25 particules d'intérêt. Le tri effectué peut alors devenir inefficace. Dans les dispositifs connus, afin de poursuivre le tri, un arrêt du dispositif est nécessaire pour effectuer une nouvelle calibration, ce qui provoque une perte de temps et éventuellement une
30 perte de particules dans le cas de cellules fragiles.

La présente invention permet alors d'effectuer les corrections des paramètres de fonctionnement s'ils ont subi une dérive ou d'adapter le dispositif aux changements des conditions de fonctionnement. Les corrections des paramètres de fonctionnement peuvent être effectuées sans suspendre le flux des particules. La phase de correction peut entraîner un taux d'erreur dans les tris des particules qui peut être acceptable pour l'utilisateur. Il est également possible que les voies de sortie soient connectées à des réservoirs de collecte spécifiques pendant les étapes de corrections des paramètres de fonctionnement du moyen de tri. Après les corrections, les particules peuvent alors être réinjectées en entrée du dispositif de séparation pour être triées.

La figure 23 représente un organigramme d'un procédé de correction ou d'autocalibration selon la présente invention.

Lors de l'étape 500, on contrôle grâce à au moins un détecteur placé dans un des canaux de sortie 4, 4' la réussite ou l'échec de la déviation.

En cas de réussite, on poursuit le contrôle.

Il peut être prévu un contrôle en continu, c'est-à-dire à chaque détection de particules, ou un contrôle à des intervalles de temps déterminés.

En cas d'échec, on passe à l'étape 502, au cours de laquelle on prévoit la modification d'un ou de plusieurs paramètres de fonctionnement.

A l'étape 504, on contrôle la réussite ou l'échec du tri avec le nouveau paramètre en identifiant

les voies de sortie empruntées par les particules d'intérêt.

Si le tri a réussi, on retourne à l'étape 500 pour une surveillance du fonctionnement du dispositif.

Si le tri a échoué, on retourne à l'étape 502.

L'étape 502 de modification d'un ou de plusieurs paramètres peut s'effectuer selon l'organigramme représenté en figure 24. On peut prévoir une modification des paramètres simultanément ou successivement pour plusieurs populations de particules, car le procédé de correction ou d'autocalibration selon la présente invention peut être appliqué sur chaque population de particules de manière indépendante.

A l'étape 502.1, on définit l'ordre des paramètres de fonctionnement dans la liste des paramètres qui peuvent être modifiés. La valeur 1 est affectée au premier paramètre, qui aura été préalablement déterminé comme étant le paramètre prépondérant. La valeur 2 est affectée au deuxième paramètre et ainsi de suite.

Un indice i , correspondant au numéro du paramètre à modifier, est posé égal à 1. Le paramètre donné par l'indice i est appelé « paramètre principal ».

A l'étape 502.2, on recherche un nouvel intervalle de valeurs pour le paramètre principal.

On s'assure à l'étape 502.3 que la valeur du paramètre principal est modifiée dans un

intervalle de valeurs limites préalablement défini par l'opérateur, et/ou par le circuit électronique, et/ou par le logiciel. Si l'intervalle de valeurs proposées pour le paramètre principal et l'intervalle de valeurs
5 limites se recouvrent, on passe alors à l'étape 502.4. Si les deux intervalles ne se recouvrent pas, le paramètre principal n'est pas modifié, et on retourne à l'étape 502.2 en incrémentant l'indice i de 1 pour que le paramètre principal devienne le paramètre suivant
10 sur la liste des paramètres de fonctionnement.

Si les intervalles de valeurs proposées pour tous les paramètres de fonctionnement sont situés en-dehors des intervalles de valeurs limites, il est nécessaire de redéfinir les intervalles de valeurs
15 limites.

Si les intervalles de valeurs proposées pour un ou plusieurs paramètres de fonctionnement recouvrent tout ou partie des intervalles de valeurs limites mais que les paramètres de fonctionnement
20 modifiés ne permettent pas de réaliser le tri des particules d'intérêt, il est nécessaire de redéfinir les intervalles de valeurs limites.

A l'étape 502.4, une valeur pour le paramètre principal est choisie dans l'intervalle commun entre l'intervalle de valeurs proposées et l'intervalle de valeurs limites, puis on passe à l'étape 504 au cours de laquelle on vérifie la réussite ou l'échec du tri avec cette nouvelle valeur de paramètre.
25

30 Divers exemples d'application vont maintenant être donnés :

Exemple 1 : trieur en flux de particules,
en particulier des cellules

Le microdispositif de tri est alimenté en continu à partir d'un réservoir contenant une suspension homogène ou hétérogène de particules, en particulier des microparticules telles que des cellules. Les voies d'entrée et de sortie sont des capillaires, des canaux microfluidiques ou des canaux nanofluidiques. Le flux du liquide transportant les particules dans les canaux fluidiques est assuré par une différence de pression, par l'application d'un débit ou par un champ électrique générant un flux électrophorétique ou un flux électro-osmotique. Les particules circulant dans le canal d'entrée sont placées sur une seule file par focalisation hydrodynamique et/ou par un rétrécissement du flux par le biais d'un flux manteau et/ou par un rétrécissement de la section du canal jusqu'à des dimensions proches de celles des particules.

La méthode présentée pour l'autocalibration d'un moyen de tri en flux de particules représente une méthode générique applicable à tous les systèmes de séparation microfluidiques, et nanofluidiques. Elle est compatible avec une large gamme de moyens techniques de détection et de tri.

Le trieur de particules peut être déclenché en combinaison avec une cytométrie en flux. Dans ce cas, le tri des particules est déterminé par la détection en amont de caractéristiques physiques de la particule ou de caractéristiques qui lui ont été ajoutées préalablement par le biais d'un marquage. De

façon préférentielle, les critères de décision sont basés sur une mesure de la fluorescence, et/ou de la granulométrie, et/ou de la diffusion aux petits angles d'un faisceau lumineux et/ou de l'impédance électrique.

5 La déviation de la particule par le moyen de tri est conditionnée à la détection du ou des critères sélectionnés. Par exemple, le moyen de tri des cellules peut être déclenché en fonction de la mesure du volume de la cellule et/ou en fonction des caractéristiques
10 électriques de la cellule telles que la conductivité du cytoplasme et/ou la capacité de la membrane.

Pendant les réglages initiaux de l'appareil de séparation, des particules de taille calibrée ou possédant des propriétés physiques proches de celles
15 qui seront triées peuvent être utilisées. Une poubelle est placée provisoirement derrière toutes les voies de sortie afin de recueillir les particules employées pendant la calibration initiale de l'appareil.

Le moyen de tri est déclenché lors du
20 passage des particules. L'opération de calibration et/ou l'opération de correction en fonctionnement du moyen de tri peuvent être réalisées en déviant toutes les particules qui arrivent devant le détecteur, ou en déviant les particules d'intérêt uniquement vers une
25 voie de sortie spécifique. La réussite ou l'échec de la déviation est déduite en observant la présence ou l'absence de pics de détection sur les différents détecteurs en aval du moyen de tri.

Des opérations de traitement des signaux
30 issus des détecteurs sont effectuées simultanément à l'opération de séparation grâce à un circuit

électronique et/ou un logiciel, afin de dénombrer les particules et/ou mesurer leur vitesse en temps réel. Le comptage des particules peut être mis en oeuvre dans la voie d'entrée et/ou dans chacune des voies de sortie.

5 Exemple 2: instrument de dispense de cellules :

Le dispenseur de cellules est une tête d'éjection de gouttelettes qui intègre une entrée et des canaux microfluidiques pour l'injection et le
10 transport d'une suspension cellulaire, des capteurs pour la détection des cellules dans la tête d'éjection, ainsi qu'un éjecteur pour générer des gouttelettes contenant des cellules (Figure 22). Le canal microfluidique d'entrée 2 se sépare en deux voies de
15 sortie 4, 4'. La voie de sortie 4 est munie d'un détecteur 6. L'autre voie de sortie 4', qui ne possède pas de détecteur, débouche sur un autre orifice.

La méthode d'autocalibration décrite dans cette invention permet de paramétrer le microdispenseur
20 et de contrôler son fonctionnement en temps réel. L'éjecteur est utilisé comme moyen de tri pour diriger les cellules d'intérêt vers l'orifice. L'éjecteur est par exemple une vanne solénoïde miniaturisée ou une céramique piézoélectrique positionnée près de
25 l'embranchement des voies de sortie. Initialement, l'éjecteur est au repos ; en conséquence, le liquide emprunte la voie de sortie 4 munie du détecteur 6. De façon préférentielle, les détecteurs utilisent des moyens de mesure optiques et/ou électriques pour
30 détecter en flux les cellules et, éventuellement identifier et caractériser les cellules. En cas de

population cellulaire hétérogène, le moyen de tri peut être déclenché uniquement pour les cellules d'intérêt. Les autres types cellulaires sont emportés par le flux dans le canal de sortie 4 muni du détecteur 6.

5 Sur la figure 22, on peut voir une représentation schématique d'un tel microdispenseur. Une cellule C d'intérêt en circulation dans le microcanal d'entrée 2 est tout d'abord détectée par le détecteur en amont 8. Puis, lorsque la cellule arrive
10 devant l'embranchement 12, l'éjecteur 10 est déclenché afin de dévier la cellule vers un orifice 14. De façon simultanée, le déclenchement de l'éjecteur 10 permet de dévier la trajectoire de la cellule d'intérêt et génère une pression hydraulique suffisante pour créer une
15 gouttelette à la sortie de l'orifice 14. La gouttelette contenant la cellule d'intérêt est propulsée à travers l'orifice 14 et se dépose sur un substrat 16.

L'apparition ou l'absence d'un pic de détection sur le détecteur 6 dans le canal de sortie 4
20 indique si les paramètres de fonctionnement de l'éjecteur sont corrects ou inappropriés, en fonction de la population cellulaire concernée.

La calibration de l'éjecteur et la correction de l'éjecteur en fonctionnement s'appliquent
25 pour le tri des cellules d'intérêt. Dans ce cas, l'éjecteur est considéré comme un moyen de tri actif. Deux possibilités se présentent pour caractériser le tri :

- un pic de détection sur le détecteur 8,
30 qui est suivi d'un pic de détection sur le détecteur 6, montre que le tri de la cellule d'intérêt a échoué,

c'est-à-dire que la cellule n'a pas été déviée vers l'orifice 14;

- un pic de détection sur le détecteur 8, qui n'est pas suivi d'un pic de détection sur le détecteur 6, montre que le tri de la cellule d'intérêt a réussi, c'est-à-dire que la particule a été orientée vers l'orifice 14.

La calibration de l'éjecteur et la correction de l'éjecteur en fonctionnement concernent également le tri des autres particules. Dans ce cas, l'éjecteur est considéré comme un moyen de tri passif car il est maintenu au repos lors du passage de la particule. Lorsque la microparticule n'est pas une cellule d'intérêt, elle ne doit donc pas être déposée sur le substrat 16. Deux possibilités se présentent pour caractériser le tri :

- un pic de détection sur le détecteur 8 suivi d'un pic de détection sur le détecteur 6 montre que le tri de cette particule a réussi, c'est-à-dire que la particule n'a pas été déviée vers l'orifice 14,

- un pic de détection sur le détecteur 8 qui n'est pas suivi d'un pic de détection sur le détecteur 6 montre que le tri de cette particule a échoué, c'est-à-dire que la particule a été orientée vers l'orifice 14.

Le dépôt des cellules d'intérêt dans un volume de liquide calibré peut constituer un autre mode d'utilisation du dispenseur de cellules. La durée d'actionnement et la force de déviation peuvent être optimisées pendant la calibration du moyen de tri afin

que le volume de dispense corresponde au volume recherché.

La méthode présente peut être appliquée pour la calibration et/ou la correction en
5 fonctionnement du microdispenseur décrit dans le document non publié FR 04 00433, mais elle est aussi applicable à tout système fluide comportant un moyen de tri. La méthode décrite ici peut être appliquée à la
10 grande majorité des systèmes microfluidiques présentés dans la littérature, afin d'automatiser la recherche des conditions de fonctionnement du trieur et corriger les dérives en temps réel.

Le tri sur puce, en particulier pour isoler et enrichir des populations cellulaires, représente
15 actuellement un domaine important de recherche technologique. La séparation de particules d'intérêt est ainsi une brique technologique de base qui pourrait être intégrée sur une puce avec des étapes d'analyse chimique et/ou biologique, de caractérisation des
20 populations, de stimulation (biochimique ou autre), de matriçage, de stockage, de culture cellulaire,...

REVENDICATIONS

1. Procédé de calibration d'un dispositif de tri en flux de particules, ledit dispositif
5 comportant un canal d'entrée (2) et au moins deux canaux de sortie (4,4'), un moyen de tri de particules (10) et au moins un moyen de détection de particules (6,6') disposé dans un canal de sortie (4,4'), ledit procédé comportant l'étape de réglage d'au moins un des
10 paramètres de fonctionnement principaux du moyen de tri parmi la force de déviation (F) apte à être appliquée par le moyen de tri (10) à ladite particule et/ou la durée d'application de ladite force (F).

15 2 Procédé selon la revendication précédente, dans lequel le réglage du paramètre principal comporte :

- le choix d'une valeur du paramètre,
- la mesure de l'efficacité de cette valeur
20 par vérification de la réussite d'un tri,
- la modification de la valeur du paramètre jusqu'à obtenir au moins un tri réussi.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, comportant l'étape supplémentaire de détermination d'un
25 intervalle de valeurs efficaces pour le paramètre principal.

4. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel la détermination d'un
30 intervalle de valeurs efficaces comporte la

détermination des bornes de l'intervalle à partir d'une valeur efficace du paramètre principal.

5 5. Procédé selon la revendication
5 précédente, dans lequel :
 - la valeur efficace est modifiée,
 - l'efficacité de cette valeur modifiée est
 testée,
 - la valeur est augmentée ou réduite en
10 fonction du résultat du test d'efficacité.

 6. Procédé de calibration selon l'une
 quelconque des revendications 3 à 5, ledit dispositif
 étant apte à trier au moins une première et une
15 deuxième population de particules d'intérêt, comportant
 les étapes :
 - de détermination d'un premier intervalle
 de valeurs efficaces du paramètre principal pour la
 première population de particules,
20 - de détermination d'un deuxième
 intervalle de valeurs efficaces du paramètre principal
 pour la deuxième population de particules,
 - de choix des valeurs du paramètre
 principal pour les première et deuxième populations
25 dans les premier et deuxième intervalles
 respectivement.

 7. Procédé de calibration selon la
 revendication précédente, dans lequel le choix d'une
30 valeur unique du paramètre principal pour les
 différentes populations, s'effectue dans un intervalle

de recouvrement entre les premier et deuxième intervalles.

8. Procédé de calibration selon l'une
5 quelconque des revendications 3 à 5, ledit dispositif étant apte à trier au moins une première et une deuxième populations de particules d'intérêt, comportant les étapes :

- de détermination d'un premier intervalle
10 de valeurs efficaces du paramètre principal pour la première population de particules,

- de détermination d'une valeur efficace du paramètre principal pour la deuxième population dans le premier intervalle,

15 - de détermination d'un deuxième intervalle de valeurs efficaces pour la deuxième population dans le premier intervalle,

- de choix des valeurs du paramètre principal pour la première et la deuxième populations
20 dans les premier et deuxième intervalles respectivement.

9. Procédé de calibration selon la revendication précédente, dans lequel une valeur unique
25 du paramètre principal pour les différentes populations est choisie dans le deuxième intervalle.

10. Procédé de calibration selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel
30 d'autres paramètres de fonctionnement du dispositif peuvent être réglés, tels que la durée avant

déclenchement correspondant au temps écoulé entre la détection d'une particule dans le canal d'entrée en amont du moyen de tri et le passage de ladite particule au niveau du moyen de tri.

5

11. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel la durée avant déclenchement est obtenue à partir de la détermination de la vitesse de déplacement d'une particule d'intérêt dans le dispositif de tri.

10

12. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel le moyen de tri n'est pas activé lors de la détermination de la vitesse de la particule.

15

13. Procédé selon la revendication 11, dans lequel le moyen de tri est activé lors de la détermination de la vitesse de la particule.

20

14. Procédé selon l'une des revendications 11 à 13, dans lequel la vitesse de la particule est obtenue à partir des signaux de détection fournis par un moyen de détection amont (8), un moyen de détection (6,6') d'un canal de sortie (4,4') et de la distance entre ces deux détecteurs (8,6,6').

25

15. Procédé selon la revendication 11, dans lequel la vitesse de la particule est calculée à partir de la durée d'un pic de détection fourni par un détecteur (8) dans le canal d'entrée (2) et/ou par un

30

détecteur (6, 6') dans un canal de sortie (4, 4') et de la distance parcourue par la particule entre un début et une fin de ce pic.

5 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 15, dans lequel la détermination de la durée avant déclenchement comporte :

- le choix d'une valeur de durée avant déclenchement, les valeurs de la force de déviation et
- 10 de la durée d'application étant maintenues constantes,
- l'essai de l'efficacité de cette valeur,
- la modification de cette valeur jusqu'à obtention d'un tri réussi.

15 17. Procédé selon la revendication précédente, comportant l'étape de détermination d'un intervalle de valeurs efficaces pour la durée avant déclenchement.

20 18. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel à partir d'une valeur de durée de déclenchement efficace, des essais de tri efficace sont effectués avec des valeurs de durée augmentées et/ou diminuées par rapport à la valeur adaptée.

25 19. Procédé de correction des paramètres de fonctionnement d'un dispositif de tri en flux de particules en fonctionnement, comportant les étapes :

- de vérification de l'efficacité du tri,

- de modification d'au moins un paramètre de fonctionnement jusqu'à obtenir au moins un tri efficace.

5 20. Procédé de correction selon la revendication précédente, dans lequel la vérification de l'efficacité du tri s'effectue en permanence.

10 21. Procédé de correction selon la revendication 19, dans lequel la vérification de l'efficacité du tri s'effectue à des intervalles de temps prédéterminés.

15 22. Procédé de correction selon l'une des revendications 19 à 21, dans lequel un premier paramètre est modifié jusqu'à obtenir un tri efficace.

20 23. Procédé de correction selon la revendication précédente, dans lequel un paramètre supplémentaire est modifié si un tri efficace n'est pas obtenu.

25 24. Procédé de correction selon l'une quelconque des revendications 19 à 23, dans lequel les paramètres de fonctionnement sont au moins la force de déviation appliquée par le moyen de tri, la durée d'application de cette force et/ou le temps entre la détection de la particule à l'entrée du dispositif et son passage au niveau du moyen de tri.

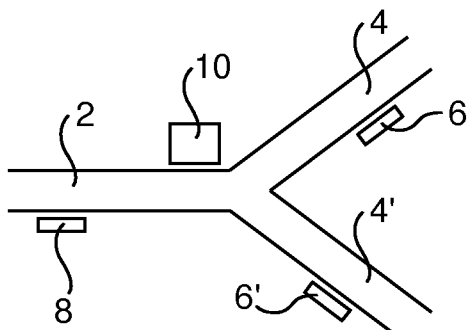


FIG. 1a

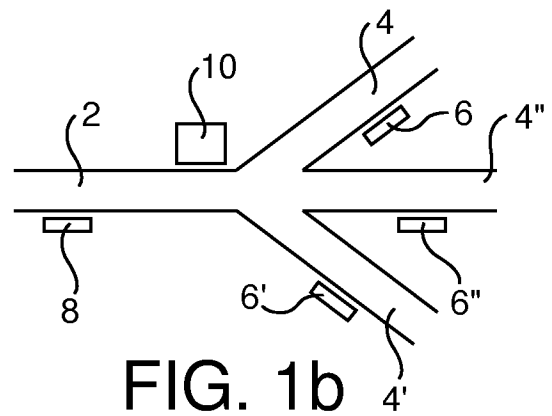


FIG. 1b

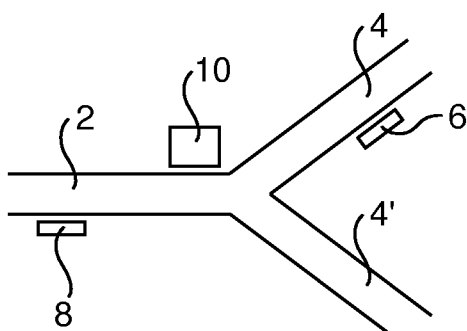


FIG. 2a

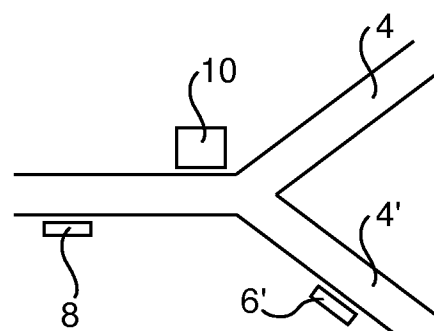


FIG. 2b

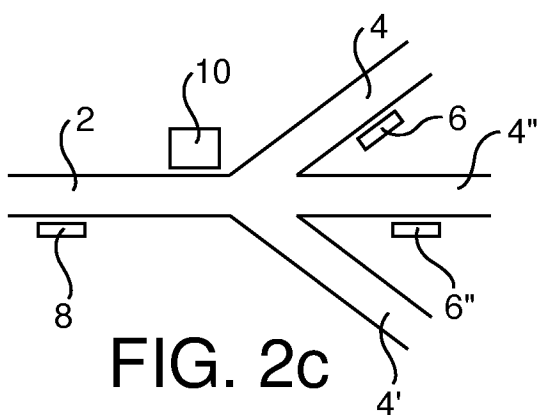


FIG. 2c

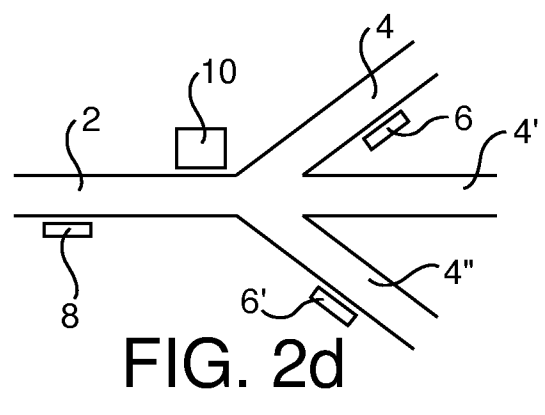
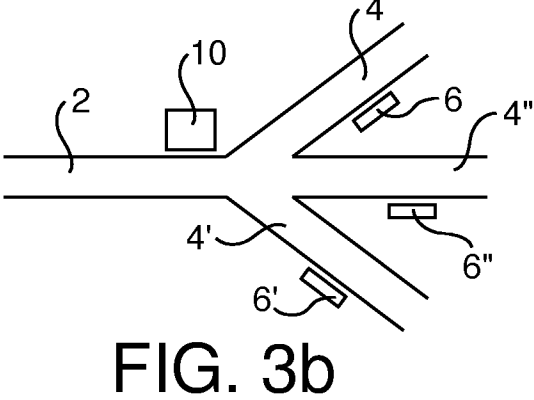
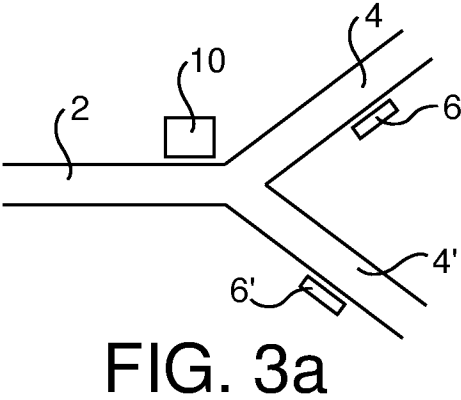
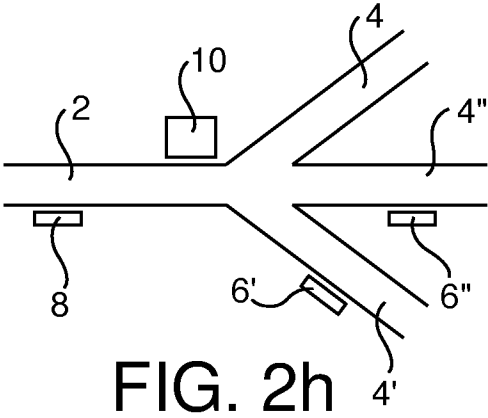
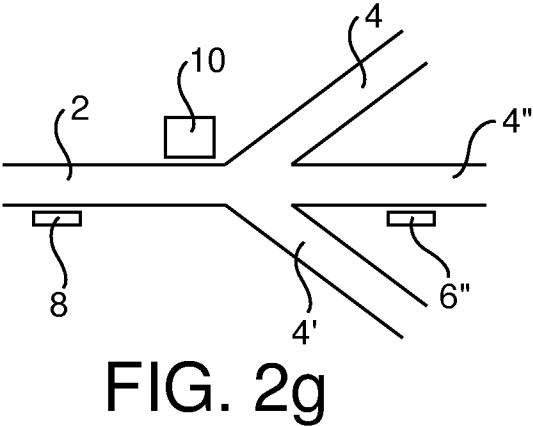
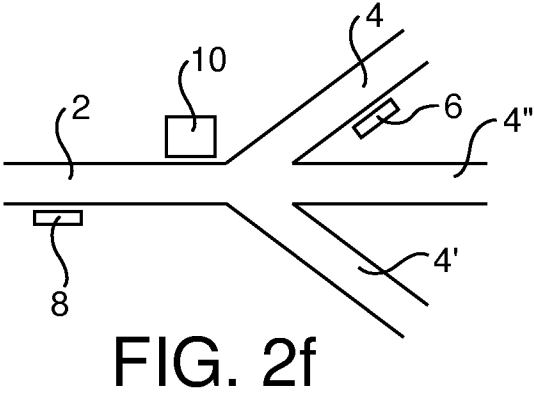
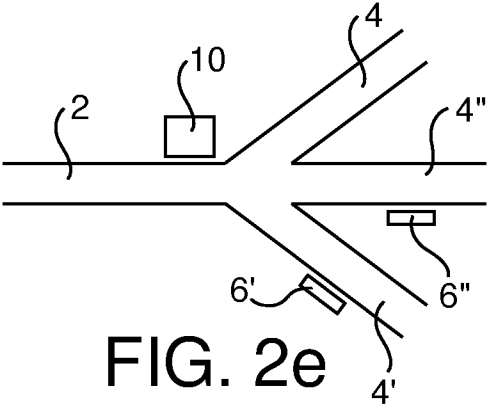


FIG. 2d



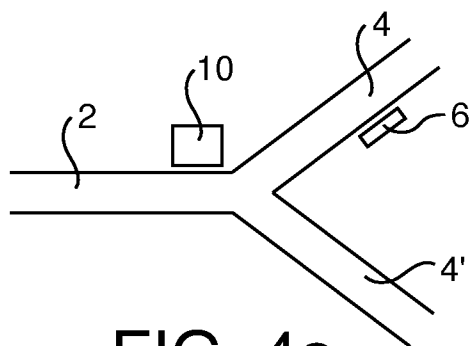


FIG. 4a

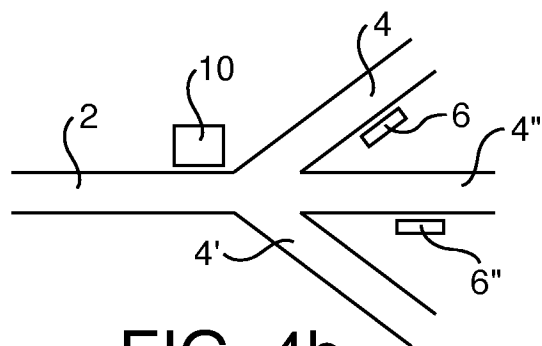


FIG. 4b

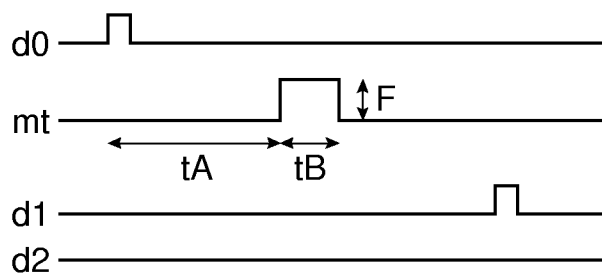


FIG. 5a

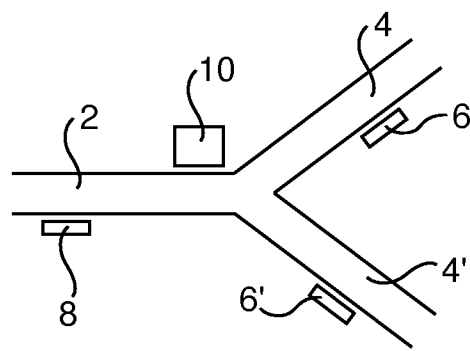


FIG. 5b

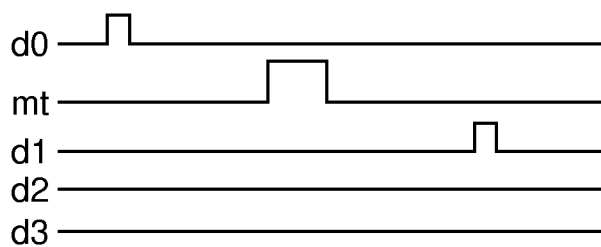


FIG. 5c

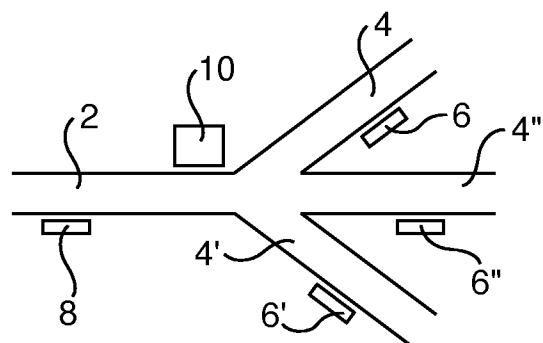


FIG. 5d

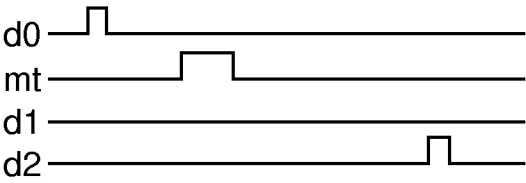


FIG. 6a

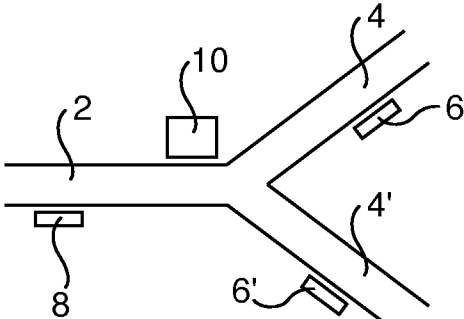


FIG. 6b

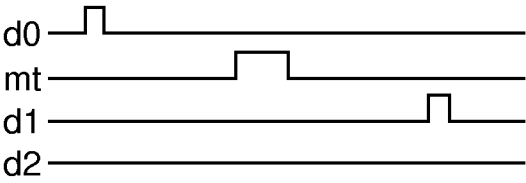


FIG. 6c

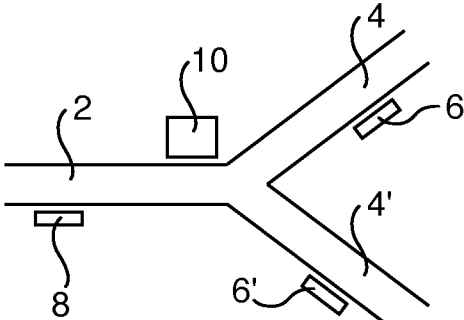


FIG. 6d

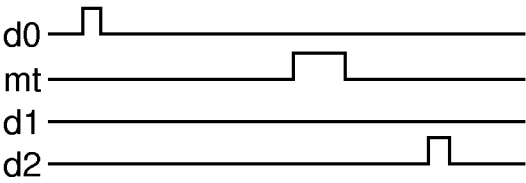


FIG. 6e

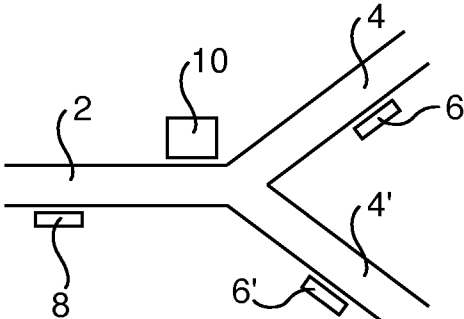


FIG. 6f

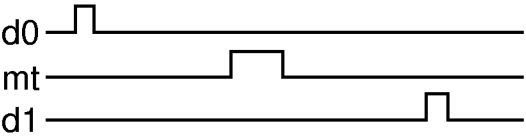


FIG. 7a

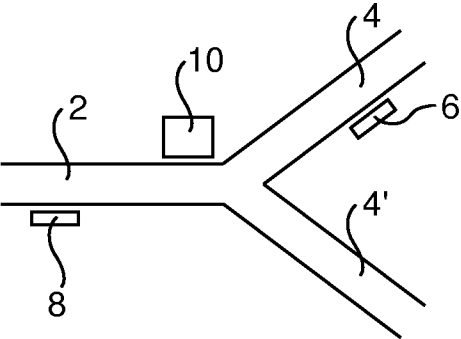


FIG. 7b

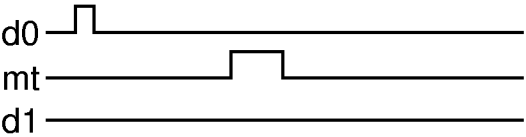


FIG. 7c

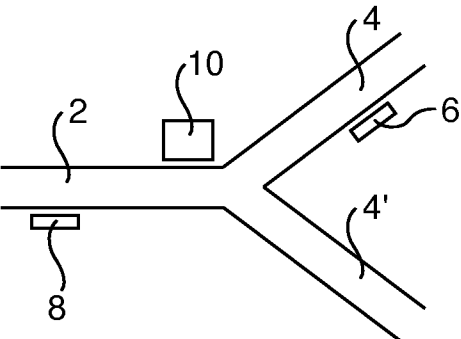


FIG. 7d

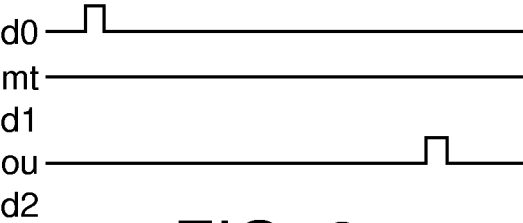


FIG. 8a

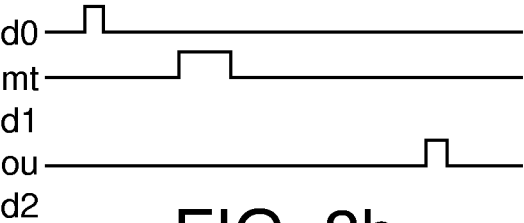


FIG. 8b

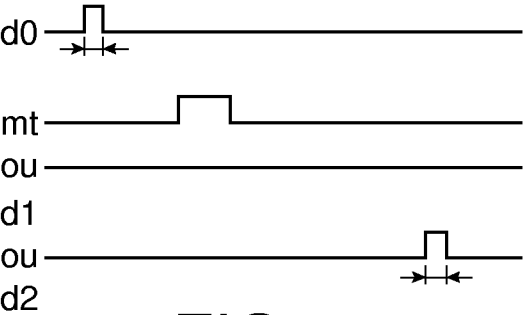


FIG. 8c

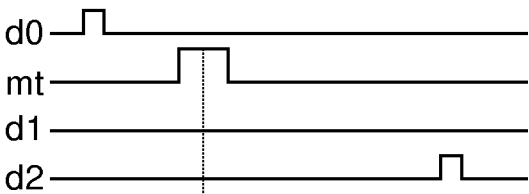


FIG. 9a

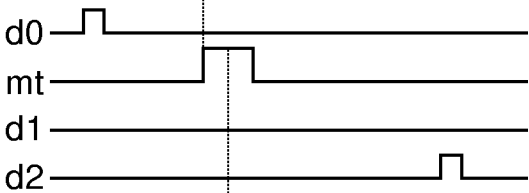


FIG. 9b

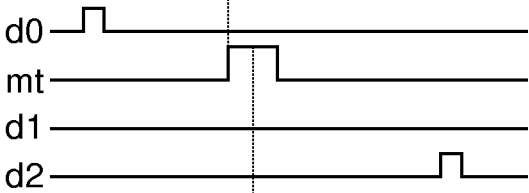


FIG. 9c

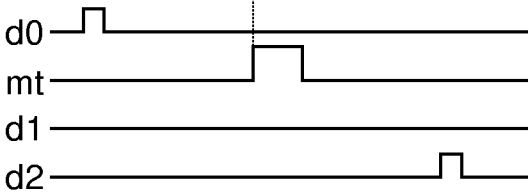


FIG. 9d

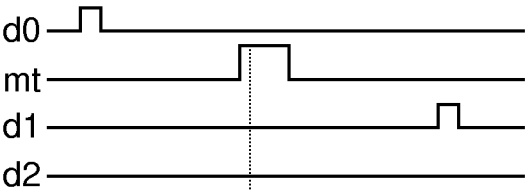


FIG. 10a

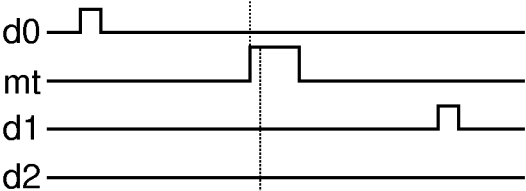


FIG. 10b

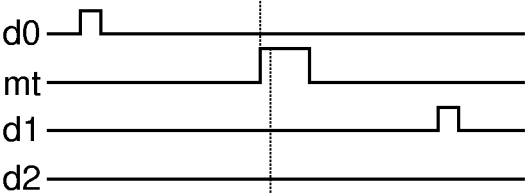


FIG. 10c

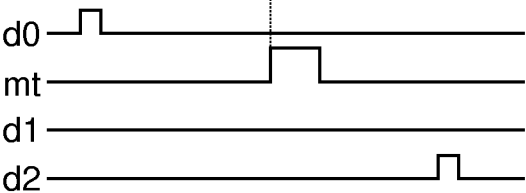


FIG. 10d

8 / 19

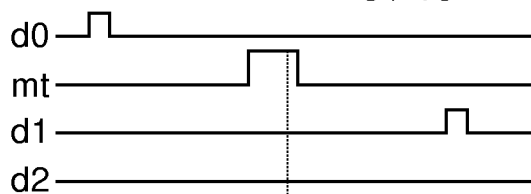


FIG. 11a

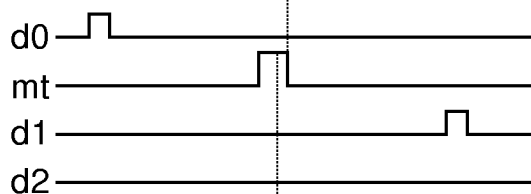


FIG. 11b

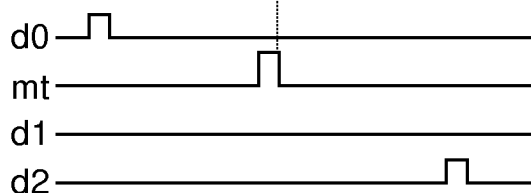


FIG. 11c

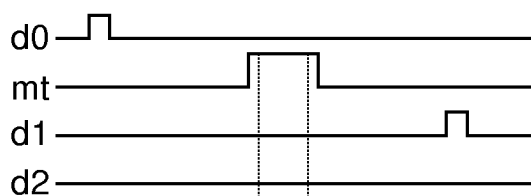


FIG. 11d

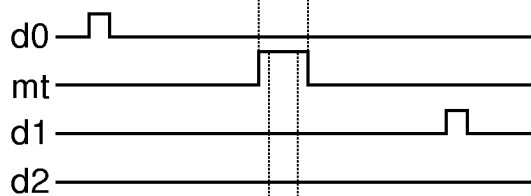


FIG. 11e

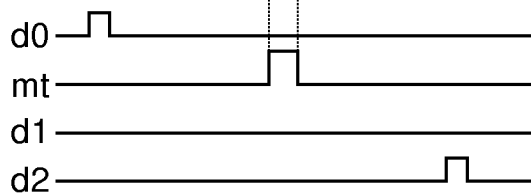


FIG. 11f

9 / 19

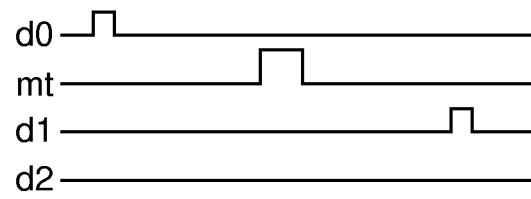


FIG. 12a

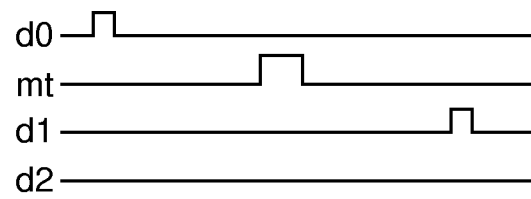


FIG. 12b

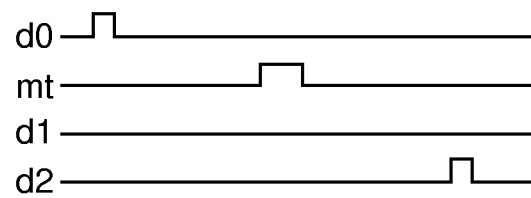


FIG. 12c

10 / 19

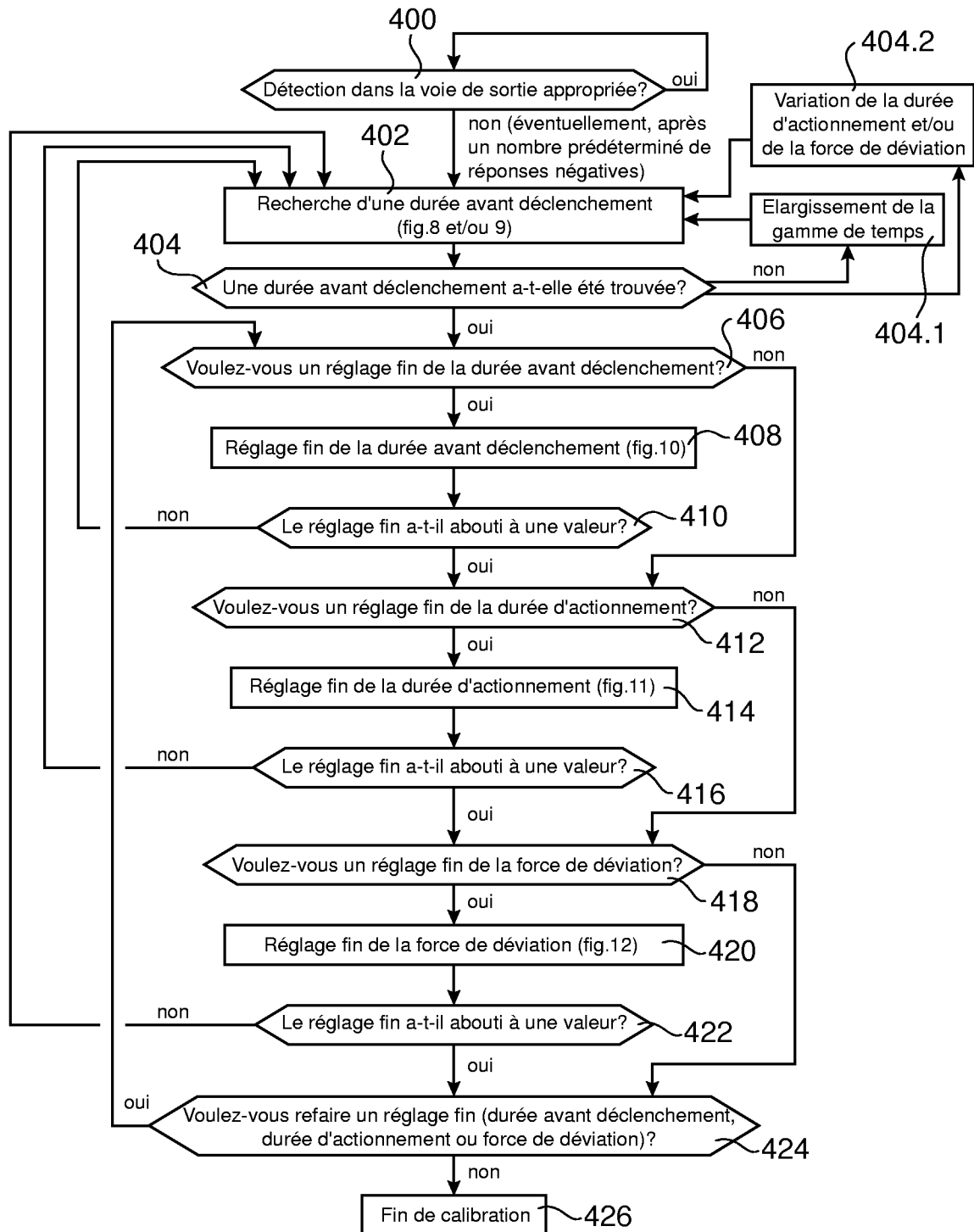


FIG. 13

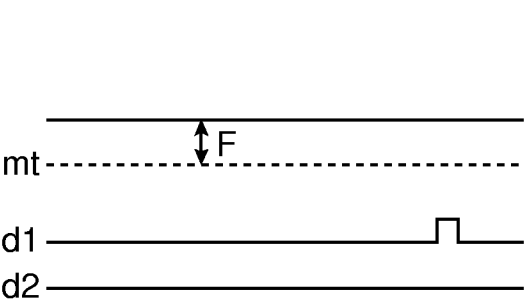


FIG. 14a

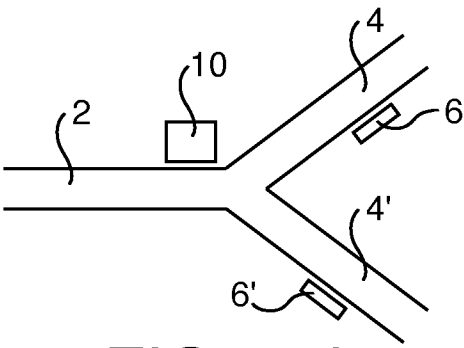


FIG. 14b

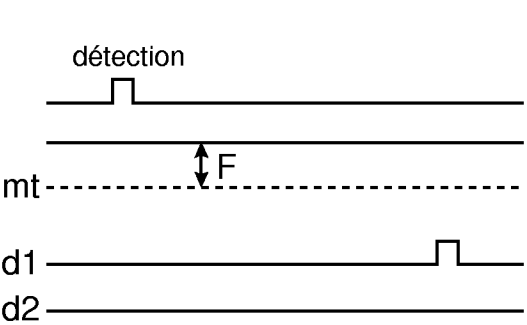


FIG. 14c

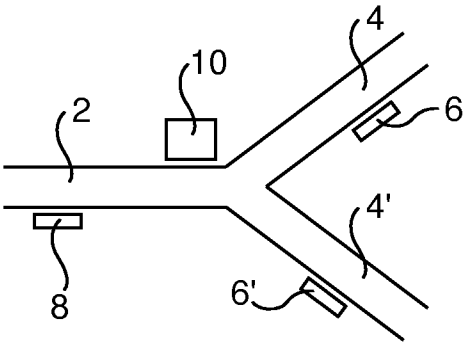


FIG. 14d

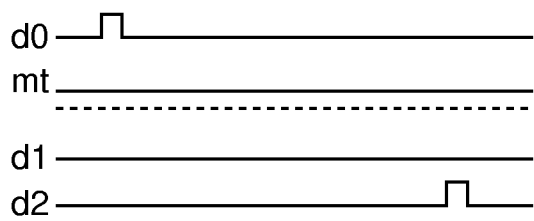


FIG. 15a

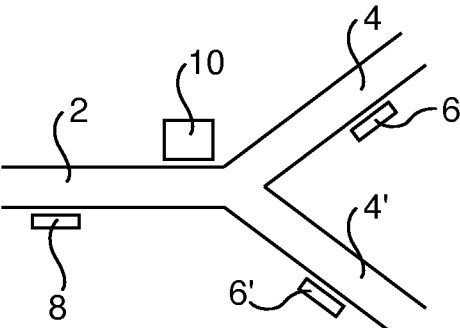


FIG. 15b

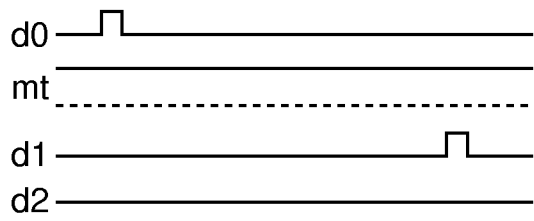


FIG. 15c

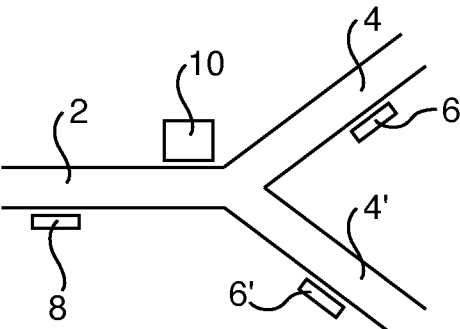


FIG. 15d

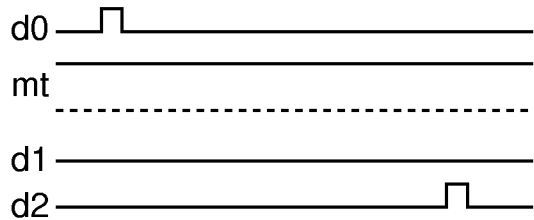


FIG. 15e

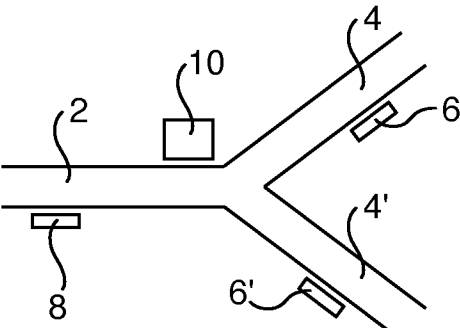


FIG. 15f

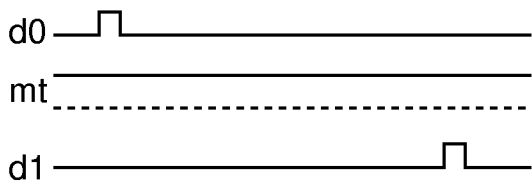


FIG. 16a

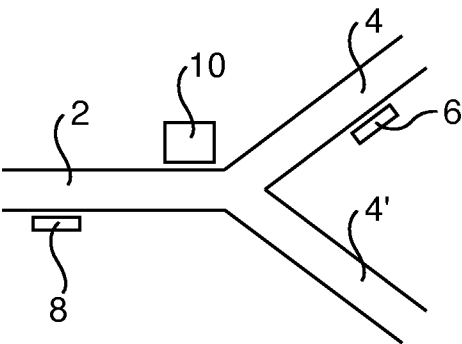


FIG. 16b

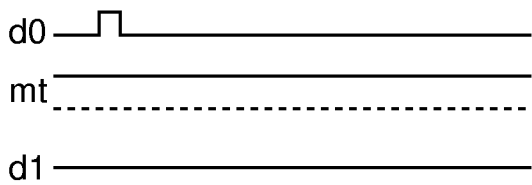


FIG. 16c

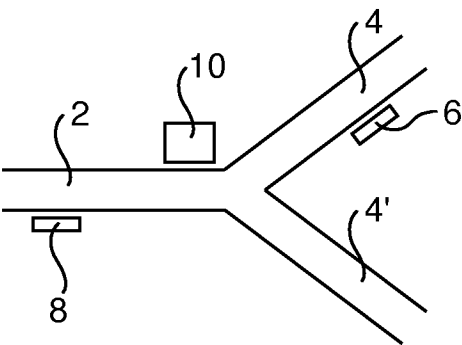


FIG. 16d

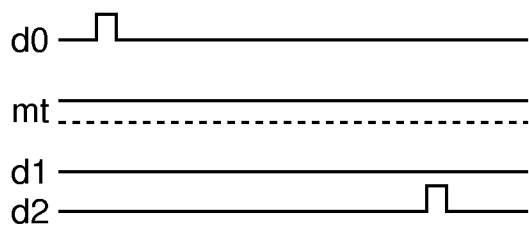


FIG. 17a

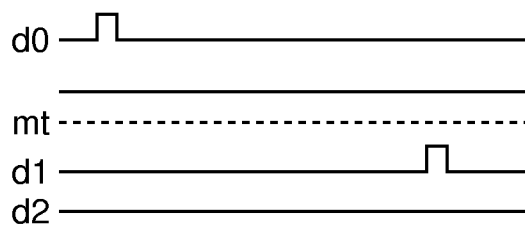


FIG. 18a

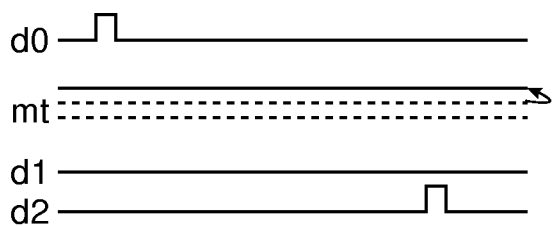


FIG. 17b

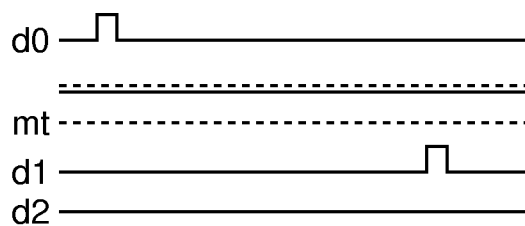


FIG. 18b

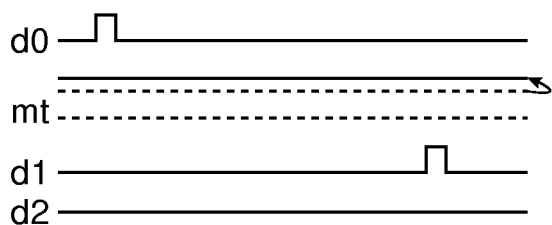


FIG. 17c

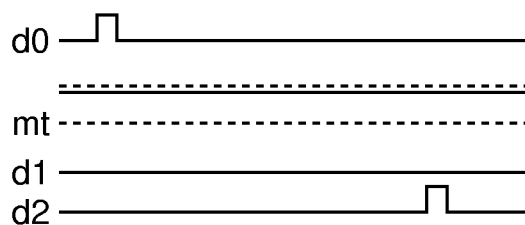


FIG. 18c

15 / 19

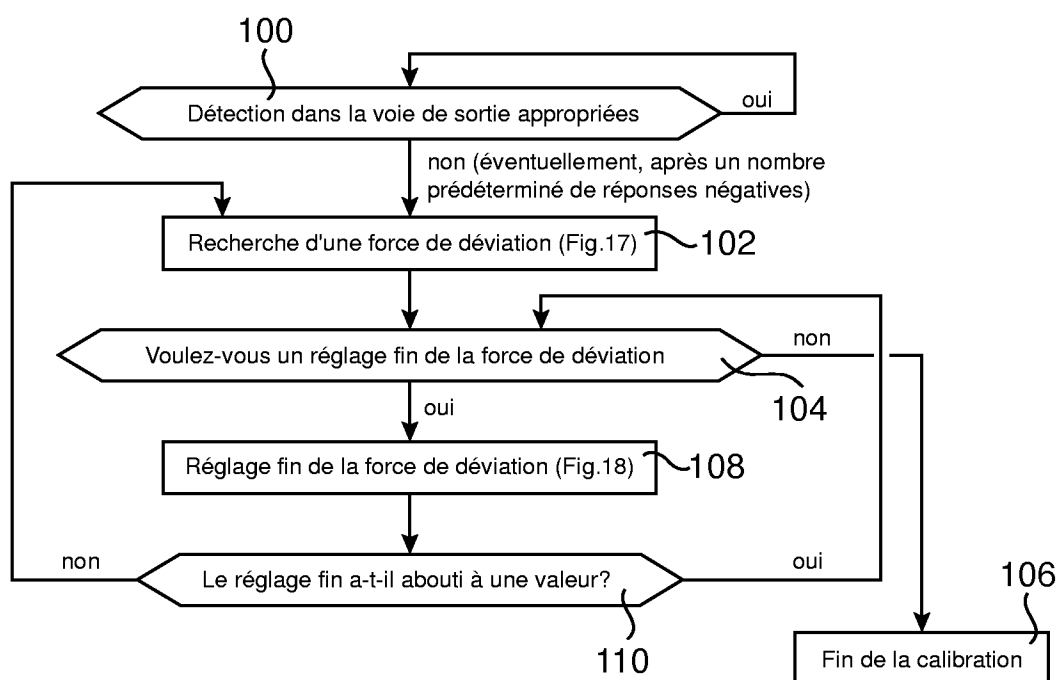


FIG. 19

16 / 19

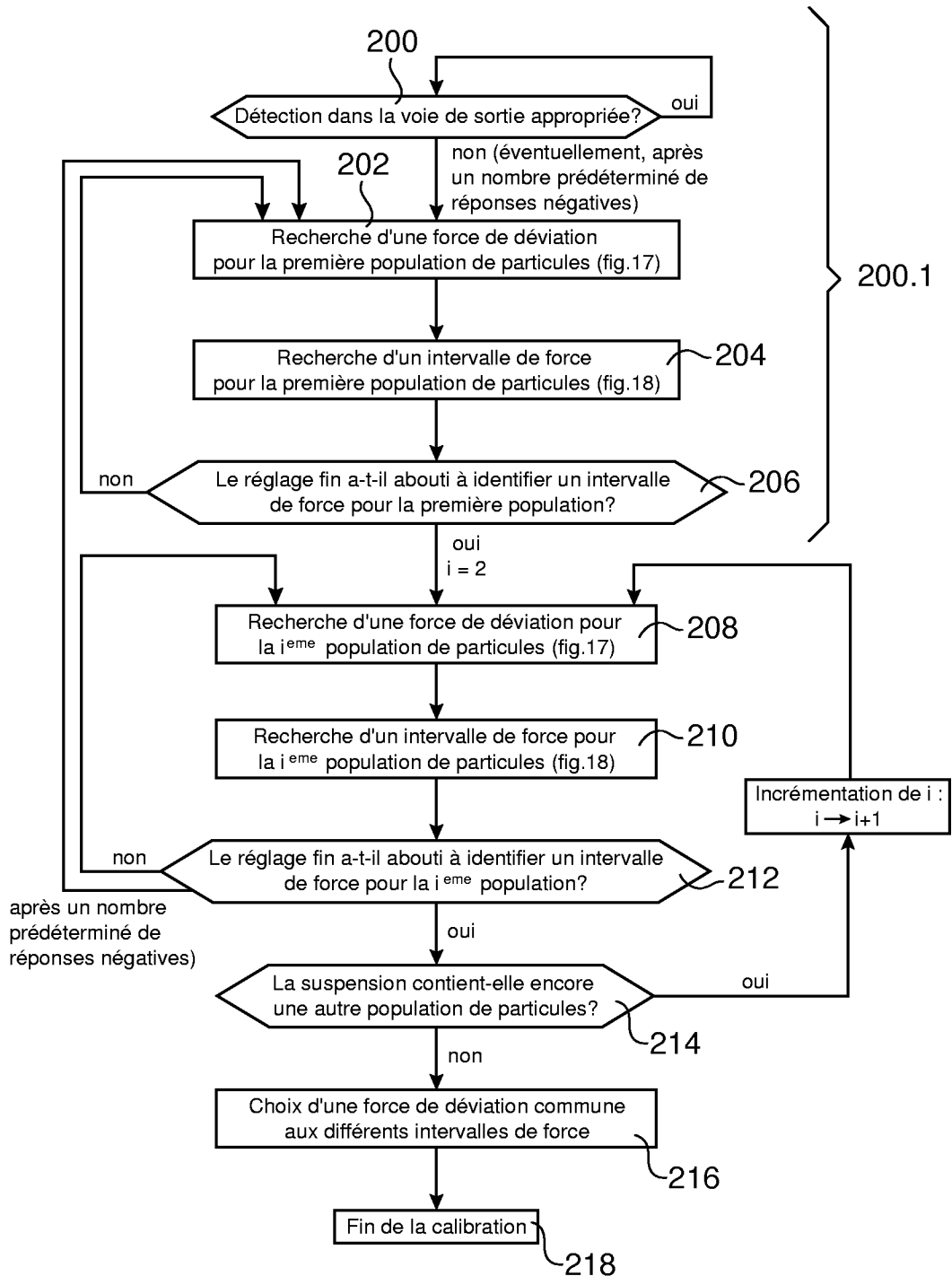


FIG. 20

17 / 19

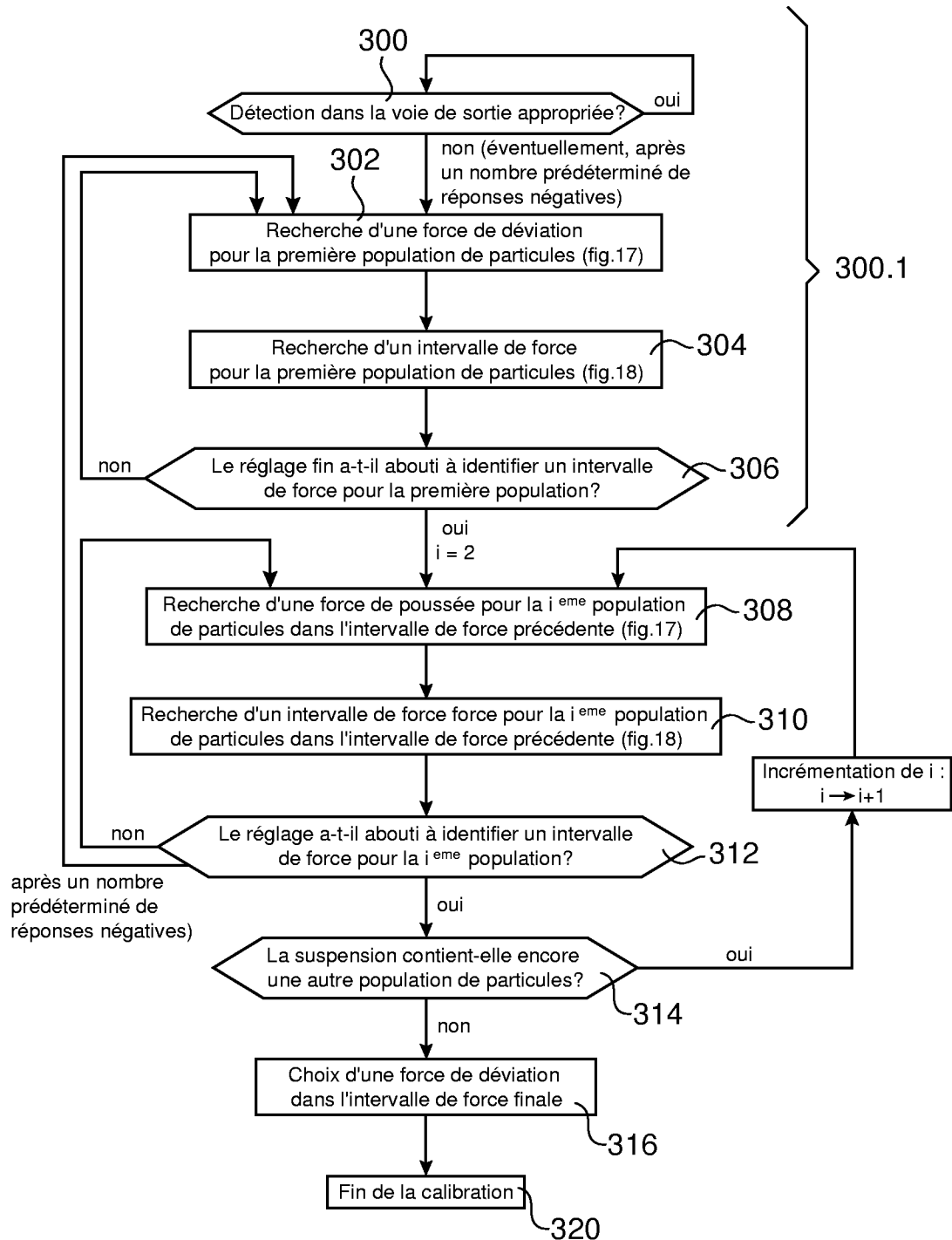


FIG. 21

18 / 19

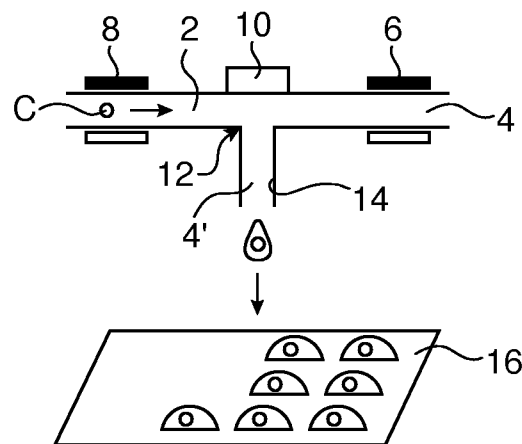


FIG. 22

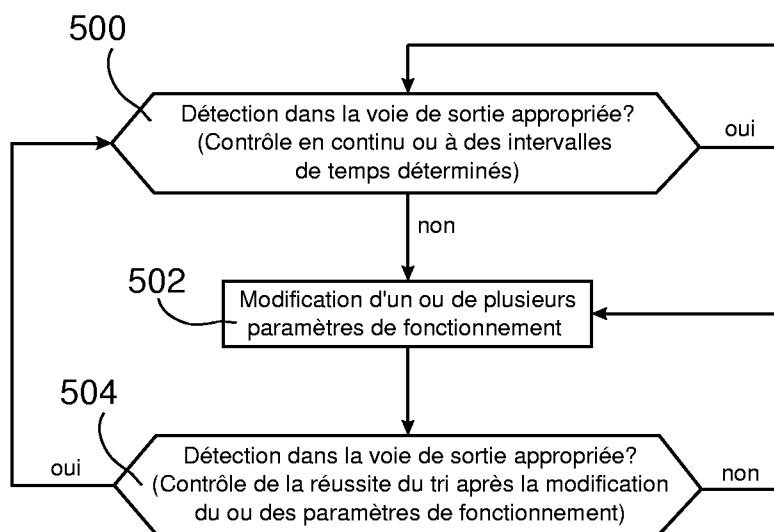


FIG. 23

19 / 19

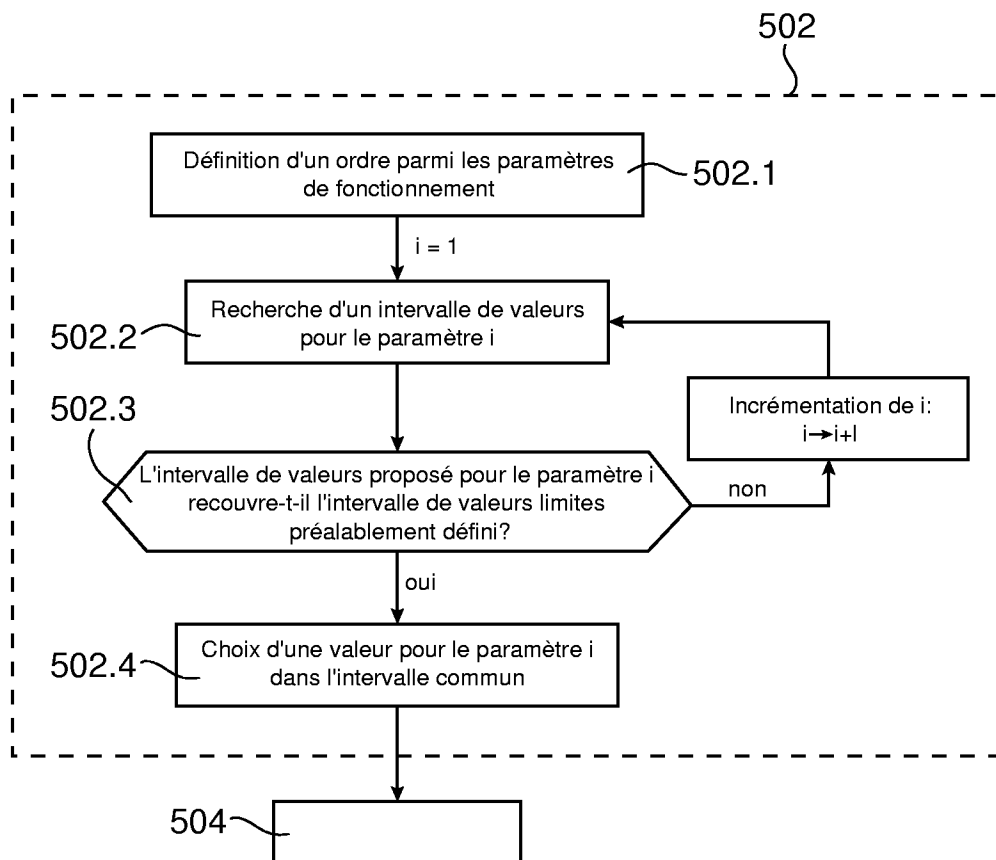


FIG. 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/064357

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N15/14

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, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/022147 A (GENOPTIX, INC; BUTLER, WILLIAM, FRANK; CHACHISVILIS, MIRIANAS; DEES, R) 10 March 2005 (2005-03-10) abstract paragraphs [0048], [0049], [0053] figures 9a,9b,11c,11d	1,10-18
X	US 3 827 555 A (KAMENTSKY L,US ET AL) 6 August 1974 (1974-08-06) cited in the application abstract column 6, line 22 - column 8, line 12 column 11, line 43 - column 12, line 38 figures 1-4 ----- -/--	16-18

☒ 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

18 September 2006

Date of mailing of the international search report

22/09/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bravin, Michel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/064357

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 372 506 B1 (NORTON PIERCE OWEN) 16 April 2002 (2002-04-16) abstract column 5, line 7 - column 10, line 45 figures 1-3 -----	1,19
X	US 6 079 836 A (BURR ET AL) 27 June 2000 (2000-06-27) abstract column 13, line 46 - line 65 figures 3,10 -----	1,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/064357

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005022147	A	10-03-2005	AU 2004269406 A1	10-03-2005
			CA 2536360 A1	10-03-2005
			EP 1668355 A1	14-06-2006

US 3827555	A	06-08-1974	NONE	

US 6372506	B1	16-04-2002	AU 5902200 A	22-01-2001
			WO 0102836 A1	11-01-2001

US 6079836	A	27-06-2000	EP 1099105 A1	16-05-2001
			JP 2002521658 T	16-07-2002
			WO 0005566 A1	03-02-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2006/064357

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. GOIN15/14

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)
GOIN

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, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2005/022147 A (GENOPTIX, INC; BUTLER, WILLIAM, FRANK; CHACHISVILIS, MIRIANAS; DEES, R) 10 mars 2005 (2005-03-10) abrégé alinéas [0048], [0049], [0053] figures 9a, 9b, 11c, 11d	1, 10-18
X	US 3 827 555 A (KAMENTSKY L, US ET AL) 6 août 1974 (1974-08-06) cité dans la demande abrégé colonne 6, ligne 22 - colonne 8, ligne 12 colonne 11, ligne 43 - colonne 12, ligne 38 figures 1-4	16-18

☒ 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

18 septembre 2006

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/09/2006

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, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Bravin, Michel

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2006/064357

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 6 372 506 B1 (NORTON PIERCE OWEN) 16 avril 2002 (2002-04-16) abrégé colonne 5, ligne 7 - colonne 10, ligne 45 figures 1-3 -----	1,19
X	US 6 079 836 A (BURR ET AL) 27 juin 2000 (2000-06-27) abrégé colonne 13, ligne 46 - ligne 65 figures 3,10 -----	1,19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2006/064357

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005022147 A	10-03-2005	AU 2004269406 A1 CA 2536360 A1 EP 1668355 A1	10-03-2005 10-03-2005 14-06-2006
US 3827555 A	06-08-1974	AUCUN	
US 6372506 B1	16-04-2002	AU 5902200 A WO 0102836 A1	22-01-2001 11-01-2001
US 6079836 A	27-06-2000	EP 1099105 A1 JP 2002521658 T WO 0005566 A1	16-05-2001 16-07-2002 03-02-2000