

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

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

2 535 051

(21) N° d'enregistrement national : 82 18039

(51) Int Cl<sup>3</sup> : G 01 N 11/04, 21/85, 33/48.

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 22 octobre 1982.

(71) Demandeur(s) : UNIVERSITE DE SAINT-ETIENNE. — FR.

(30) Priorité

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 17 du 27 avril 1984.

(72) Inventeur(s) : Bernard Faure, Georges Soldat, Jean-Claude Healy et Jean Monin.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

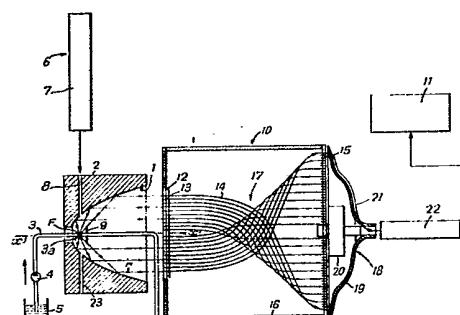
(73) Titulaire(s) :

(54) Appareil de mesure en flux continu des propriétés rhéologiques individuelles de particules déformables.

(57) Identification de propriétés multiparamétriques de particules.

L'appareil comprend :  
— un réflecteur 1 paraboloidal,  
— un conduit capillaire 3 transparent passant par le foyer F,  
— un moyen 4 de mise en circulation forcée de particules en suspension dans le conduit.

Un analyseur d'images comprenant :  
— un récepteur optique 12,  
— un anamorphoseur 17,  
— un détecteur tournant 18,  
— et une chaîne 11 de traitement des signaux délivrés.  
Application à la mesure en flux continu des propriétés rhéologiques des érythrocytes.



FR 2 535 051 - A1

D

La présente invention concerne un appareil de mesure destiné à étudier les propriétés rhéologiques d'objets microscopiques, biologiques ou non.

Dans de nombreux domaines, il est important de pouvoir apprécier les caractéristiques de déformabilité d'objets microscopiques, de manière à pouvoir déterminer l'état de viscosité de la masse qui les constitue ou l'état de plasticité de la membrane qu'ils comportent, afin, par exemple, de mesurer un état de vieillissement ou d'apprécier l'influence que peut avoir, sur de telles propriétés, la présence de substances étrangères, volontairement ou non, introduites dans un tel milieu.

A titre d'exemple, et ceci est le cas pour les érythrocytes, ces différentes informations recherchées permettent d'apprécier les mécanismes de renouvellement, de vieillissement, d'altération ou de traitement en fonction de substances étrangères, volontairement ou non, introduites dans le milieu.

En vue de pouvoir disposer de telles informations, différents types de techniques ont été proposés.

Une technique d'information globale consiste à tenter de relever des informations concernant les propriétés de visco-élasticité sur une population, par exemple, par filtration sur membrane ou, encore, au moyen d'un viscosimètre tel que celui décrit dans la demande française 74-16 160 (2 270 557).

Les informations obtenues sont de type macroscopique et ne fournissent pas de réponse permettant d'étudier les caractéristiques de vieillissement individuel, ni celles d'influence au plan unitaire de produits ou substances, volontairement ou non, introduits dans le milieu.

Dans le même type de technique, on a proposé également

de faire passer, dans un canal à paroi fixe, un liquide contenant en suspension les cellules à mesurer. Cette technique, enseignée par la demande française 80-12 592, prévoit de diriger, perpendiculairement au canal, un faisceau de lumière amené à traverser le canal et le flux à écoulement laminaire, au-delà duquel est observée la figure de diffraction reproduite.

Une telle technique prend en compte une population globale de cellules et ne permet donc pas de répondre, véritablement, au problème posé. En outre, une telle technique ne permet de disposer que d'un faible angle de diffusion ne fournissant qu'une information partielle macroscopique.

Par ailleurs, un tel procédé est lourd à mettre en oeuvre et exige une interprétation délicate de l'image de diffraction produite pour rendre compte des propriétés rhéologiques.

Une seconde voie a tenté d'aborder l'appréciation des propriétés de visco-élasticité individuelle des cellules, de manière à répondre plus précisément à l'objectif visé qui est de pouvoir apprécier, notamment, soit le vieillissement individuel de telles cellules, soit les modifications de leur comportement plastique, en liaison avec la présence de substances étrangères à leur milieu. Dans ce but, on a proposé, notamment par la DTOS 2 405 839, de disposer un microscope au-dessus d'une plaque comportant un trou de passage dont le diamètre est inférieur à celui, moyen, de chaque cellule déformable considérée individuellement. Le trou est disposé dans l'axe d'un moyen d'irradiation, tel qu'un laser. Chaque cellule à mesurer est amenée individuellement sur la plaque et on apprécie la variation du signal optique correspondant au passage d'une cellule à travers le trou.

Cette technique permet d'apprécier la déformabilité de la cellule en fonction de son temps de passage à travers le trou.

Une telle solution technique représente un progrès certain par rapport à la première méthode, puisqu'elle permet de fournir des informations en liaison avec certaines propriétés individuelles des cellules.

Cependant, les caractéristiques de déformabilité relevées ne se rapportent qu'à un régime établi pendant le passage de la

cellule dans le trou et correspondent plus à une information sur sa viscosité. En revanche, une telle méthode ne permet pas de prendre en compte la loi de déformation transitoire préalable au passage dans le trou et correspondant, plus précisément, aux capacités de 5 déformation élastique de la membrane extérieure.

Une telle méthode ne permet donc pas de tirer les enseignements nécessaires et recherchés concernant le vieillissement ou la modification du comportement élastique de la membrane responsable de ces propriétés de déformabilité.

10 Cette technique n'est pas satisfaisante non plus sur le plan technologique car, on conçoit qu'il est particulièrement délicat de réaliser la plaque et le trou de passage dont la précision et les faibles dimensions conditionnent les résultats obtenus.

On a proposé, également, dans ce second type, la mise en 15 oeuvre d'une pipette de très faible section dont l'une des extrémités ouverte est plongée dans une solution de faible concentration en cellules ou particules déformables à étudier. A partir de la seconde extrémité, une dépression est appliquée de façon à provoquer l'aspiration d'une particule astreinte à se déformer pour pénétrer 20 dans le conduit capillaire délimité par la pipette. La prise en compte des conditions de déformation s'effectue sous microscope.

Une telle technique permet, effectivement, d'apprécier les propriétés de visco-élasticité de la cellule ou particule et répond, en ce sens, au problème initialement posé.

25 Cependant, on conçoit qu'une telle technique est peu pratique car elle fait intervenir, obligatoirement, un matériel lourd et délicat à réaliser pour obtenir, à coup sûr, l'introduction d'une cellule ou particule dans le conduit capillaire de la pipette.

En outre, une telle technique ne permet pas de travailler 30 en flux continu et ne peut donc présenter qu'un intérêt expérimental.

On a tenté, également, de proposer une autre solution consistant à marquer chaque cellule ou particule avec une sonde fluorescente. Cette technique fait intervenir l'introduction d'un produit approprié, tel que le 1-6 diphenyl-hexatriène (DPH), dans la suspension contenant les cellules ou particules, de manière que la 35 membrane de chacune d'elles soit pourvue en surface d'une molécule

fluorescente.

Les cellules ou particules sont asteintes à passer dans un tube capillaire n'autorisant qu'un passage individuel en regard de l'objectif d'un microscope vis-à-vis duquel est disposé un moyen 5 d'irradiation, tel qu'un laser, destiné à provoquer l'illumination de la sonde fluorescente.

Par une telle technique, il devient possible d'étudier la polarisation de fluorescence de la sonde, donc l'implantation ou l'ancreage sur la membrane, ainsi que la durée d'illumination.

10 Cette technique n'apparaît pas satisfaisante car elle ne fournit qu'une indication ou qualification locale et non générale de la membrane, puisque la polarisation de la sonde fluorescente n'est influencée que par la zone locale de la membrane où elle est ancrée.

15 En outre, cette technique ne permet pas de disposer d'une information spatiale quant à la forme et ne fournit, par conséquent, aucune indication quant à l'état de déformation permanente ou temporaire d'une cellule ou particule permettant de déterminer ses conditions de vieillissement ou de réaction face à une substance étrangère, volontairement ou non, introduite dans le milieu.

20 On aurait pu penser à utiliser un appareil décrit dans une demande ultérieure française déposée par la Demanderesse et concernant un appareil de mesure optique des propriétés multiparamétriques de particules. Cependant, les moyens techniques composant cet appareil sont exclusivement retenus dans le but de l'étude des 25 conditions de passage, des formes ou de la granulométrie de particules, c'est-à-dire un domaine technique autre que celui concerné.

Bien qu'offrant une possibilité d'appréciation spatiale des propriétés multiparamétriques, les moyens de cet appareil sont inadaptés pour mesurer les propriétés de visco-élasticité, c'est-à-30 dire pour étudier les déformations d'objets déformables sous l'effet de contraintes extérieures.

Un tel appareil ne pouvait donc être utilisé pour résoudre le problème posé dans le domaine technique concerné qui est celui des propriétés rhéologiques d'objets déformables.

35 La présente invention vise à résoudre le problème ci-dessus en proposant un appareil de mesure permettant d'apprécier,

en flux continu, les propriétés rhéologiques individuelles d'objets déformables, en régime transitoire ou en régime établi.

Un autre objet de l'invention est de proposer un matériel relativement simple, fiable et pouvant être produit à un prix de revient sans commune mesure avec celui des techniques actuellement retenues.

5 Un objet supplémentaire de l'invention est de proposer un matériel de mesure permettant de recueillir une information quasi spatiale pour chaque objet examiné, de manière à pouvoir disposer 10 d'une information maximale concernant sa forme dans l'espace, ainsi que ses capacités de déformation liées aux propriétés des éléments le composant, telle que la masse visqueuse interne et la membrane l'entourant.

15 Un objet supplémentaire de l'invention est de proposer un nouvel appareil de mesure permettant d'apprécier en flux continu les propriétés individuelles de visco-élasticité d'objets au sein d'un échantillon ou d'une population et d'établir, au fur et à mesure de l'acquisition des données individuelles, une distribution de ces propriétés au sein de la population étudiée.

20 Pour atteindre les buts ci-dessus, l'appareil de mesure en flux continu des propriétés individuelles d'objets, du type précédent comprenant un réflecteur, un conduit capillaire transparent passant par le foyer du miroir et assurant le cheminement individuel d'objets, un moyen d'irradiation, selon une direction normale à l'axe 25 du conduit, de la partie dudit conduit passant au foyer, un masque n'occultant que les rayons diffractés non réfléchis, une cellule photosensible recevant les rayons diffractés réfléchis et des moyens de traitement des signaux fournis par la cellule, est caractérisé en ce que, dans son application à la mesure des propriétés de visco-élasticité 30 individuelle d'objets déformables il comporte :

- un réflecteur constitué par un miroir paraboloidal,
- un conduit capillaire transparent de section constante possédant, dans sa partie traversant le foyer, une modification de section incluant, 35 selon le sens de circulation des cellules, un

convergent-divergent,

- un moyen de mise en circulation forcée dans le conduit de cellules déformables en suspension,

- un analyseur d'images comprenant :

5 . un récepteur optique mosaïque plan,

. un anamorphoseur,

. et un détecteur tournant associé à un seul capteur photoélectrique.

- et une chaîne de traitement des signaux délivrés par l'analyseur.

Diverses autres caractéristiques ressortent de la description faite ci-dessous en référence au dessin annexé qui montre, à titre d'exemple non limitatif, une forme de réalisation de l'objet de l'invention.

15 La fig. 1 est une vue schématique de l'appareil conforme à l'invention.

La fig. 2 est une vue partielle schématique montrant, à plus grande échelle, un détail de réalisation.

20 L'appareil de mesure en flux continu des propriétés individuelles de visco-élasticité d'objets, de particules ou cellules déformables comprend un réflecteur 1 monté sur un support quelconque non représenté au dessin. Le réflecteur 1 est constitué, au sens de l'invention, par un miroir paraboloidal dont la surface réfléchissante polie comporte un revêtement de rhodium.

25 Le miroir 1 est associé à un conduit capillaire 3 réalisé en une matière transparente et présentant un diamètre utile interne en relation avec la dimension moyenne des objets ou cellules à étudier. Les cellules sont entraînées en circulation forcée à l'intérieur du capillaire 3 par l'intermédiaire d'une pompe 4 puisant dans une réserve 5 contenant une suspension à analyser.

Le conduit capillaire 3 est associé au miroir 1, de manière qu'une partie rectiligne le composant passe par le foyer F de ce miroir. Dans la forme de réalisation illustrée à la fig. 1, le conduit 3 traverse le sommet du miroir et s'étend le long de l'axe x-x' de révolution de ce dernier. Cependant, il doit être considéré que le conduit capillaire 3 pourrait être disposé différemment, de manière que sa partie rectiligne passe par le foyer F en suivant, par

exemple, une direction radiale en considération de l'axe x-x'.

Le conduit 3 s'étend sur toute la longueur axiale du miroir 1, au-delà duquel il est raccordé à un appareil d'évacuation, de triage, de réception ou d'utilisation de la suspension formée par le fluide véhicule et les cellules.

Ainsi que cela apparaît plus en détail à la fig. 2, le conduit capillaire 3 est conformé pour comporter, dans sa partie rectiligne passant par le foyer F, une portion rétrécie 3a. Cette portion 3a comprend un convergent 3a<sub>1</sub>, un segment ou passage 3a<sub>2</sub> de section constante et un divergent 3a<sub>3</sub>. La section du segment 3a<sub>2</sub> est choisie notamment inférieure à celle constante du conduit 3, par exemple de l'ordre de 1/3.

L'appareil comprend, par ailleurs, un moyen 6 d'irradiation du foyer F. Ce moyen 6 est constitué par une source 7 d'émission d'un rayonnement, à rayons parallèles, destiné à être dirigé selon une direction normale à la partie du conduit 3 traversant le foyer F en étant, en outre, axée sur ce dernier. La source 7 peut être constituée, par exemple, par un laser hélium-néon pour l'étude de la déformabilité des erythrocytes. La source 7 est choisie pour former au foyer F une tache lumineuse d'un diamètre, de l'ordre de grandeur du diamètre extérieur de la partie non rétrécie du conduit 3.

Le moyen d'irradiation 6 comprend, par ailleurs, un trou 8 qui est ménagé dans le miroir 1, de manière à conduire le faisceau émis en direction du foyer F.

Dans le cas de réalisation illustré par la fig. 1, le trou 8 est pratiqué radialement dans le miroir 1 par rapport à l'axe x-x', de façon à être centré sur le foyer F. Dans certains cas, il pourrait être envisagé de ménager le trou 8 au sommet du miroir lorsque le conduit capillaire 3 occupe une direction radiale par rapport à l'axe de révolution x-x'.

L'appareil comprend, de plus, un masque 9 qui est, dans l'exemple illustré, porté par le capillaire 3, de manière à s'étendre perpendiculairement à l'axe x-x'. La surface du masque 9 est choisie de manière à occulter le rayonnement diffracté non réfléchi émis, comme cela ressort de ce qui suit.

L'appareil comprend aussi, en association avec le miroir

1, un analyseur d'image 10 destiné à recevoir le rayonnement diffracté réfléchi par le miroir 1. Cet analyseur est conçu pour posséder, d'une part, une bande passante se trouvant en rapport avec la longueur d'onde du moyen 7 et, d'autre part, une linéarité de réponse 5 très supérieure à celle des analyseurs d'images commercialisés.

L'analyseur 10 est associé à une chaîne 11 de traitement et d'exploitation des signaux qu'il émet, cette chaîne comportant des moyens d'identification, de comparaison et de mise en mémoire des signaux fournis.

10 L'analyseur 10 comprend un récepteur optique mosaïque plan 12 qui est orienté perpendiculairement à l'axe x-x' pour faire face au miroir 1. Le récepteur 12 est constitué par une matrice de n points récepteurs 13 formés par les têtes d'autant de guides de lumières 14 composés de fibres optiques. Les guides 14 sont raccordés par leurs autres extrémités à une piste annulaire ou circulaire 15 portée par la face arrière du boîtier 16 de l'analyseur 10.

L'ensemble 13, 14 et 15 représente un anamorphoseur 17. La piste 15 est destinée à coopérer avec un détecteur 18, constitué par un support tournant 19 dont l'axe de rotation coïncide avec l'axe de

20 la piste 15. Le support tournant 19 est relié à un organe moteur 20, par exemple, un transformateur d'énergie électrique permettant une vitesse de rotation ajustable. Un guide optique 21 est monté radialement sur le support 19, de manière à pouvoir explorer, par l'une de ses extrémités, successivement, les n extrémités des guides 14.

25 Le guide optique 20 est raccordé par sa seconde extrémité à un seul capteur photoélectrique 22, tel qu'un photomultiplicateur ou une photodiode, connecté à la chaîne 11.

L'appareil décrit ci-dessus fonctionne de la façon suivante.

30 Le laser 7 est alimenté de manière à produire un faisceau aboutissant au foyer F et irradiant la portion 3a du conduit 3. Tant que la portion 3a n'est traversée par aucune cellule déformable et n'assure que le cheminement du fluide porteur non chargé, le faisceau aboutissant au foyer F ne subit aucune diffraction et traverse la portion 3a et le miroir 1 en suivant une lumière 23 ménagée dans ce dernier, de façon diamétralement opposée au trou 8 par rapport à l'axe x-x'.

Lorsqu'une cellule déformable cheminant dans le conduit 3 est forcée à s'engager individuellement dans la portion de section rétrécie 3a, le faisceau émis est diffracté par la présence de cette cellule. Il en résulte une émission de rayons diffractés dont, 5 compte tenu du masque 9, seuls les rayons réfléchis par le miroir 1 sont recueillis. Ces rayons réfléchis r, parallèles entre eux et à l'axe x-x', sont dirigés vers le récepteur optique plan mosaïque 12. La présence du masque 9 s'oppose à toute émission de rayonnements diffractés non réfléchis susceptibles d'atteindre le récepteur 12 10 sous une incidence quelconque par rapport au plan de ce dernier.

Les informations lumineuses, correspondant aux différents rayons diffractés et réfléchis, sont captées par les n points 13 de captation optique du récepteur 12. La mosaïque d'informations lumineuses captées est transmise par les guides 14 qui en assurent 15 l'acheminement jusqu'à la piste 15. La rotation du support 18 permet, par l'intermédiaire du guide optique 21, de prendre en compte, successivement, l'information lumineuse de chaque guide 14 et de transmettre les informations issues des n voies de transfert au capteur photoélectrique 22 unique qui est adapté aux conditions de longueur 20 d'ondes, de vitesse et de linéarité exigées par la mesure pour fournir des signaux électriques correspondant à la chaîne 11.

La vitesse d'acquisition par la rotation du support 19 peut être réglée en fonction du type de mesure recherché et du nombre d'images devant être recueillies pendant le passage forcé d'une 25 cellule dans la portion rétrécie 3a. Ainsi, il devient possible de ne prélever d'information qu'au moment où une cellule, contrainte à déformation, occupe le segment 3a<sub>2</sub>. Il est aussi possible, en faisant tourner plus rapidement le support 19, de prélever plusieurs images successives de la même cellule cheminant dans la portion rétrécie 30 3a et de pouvoir ainsi tirer une loi de déformation en régime transitoire.

Il devient ainsi possible de disposer d'informations concernant les propriétés de visco-élasticité d'une cellule, à la fois en régime transitoire et en régime établi, en disposant d'une 35 sensibilité spectrale optimale et d'une grande linéarité, étant donné que les informations correspondant à ces propriétés de visco-élasticités sont prélevées au sein d'une enveloppe quasi spatiale, compte

tenu de la position de la portion rétrécie 3a sur le foyer F. En effet, ceci permet de prélever les rayons diffractés sur au moins  $3\pi$  stéradians et de disposer, de la sorte, de la quasi totalité de la distribution angulaire des intensités diffusées et correspondant 5 au comportement rhéologique d'une cellule et aux caractéristiques de déformabilité autorisées par l'état de la masse visqueuse et celui de la membrane périphérique l'entourant.

L'examen des capacités de déformation permet, ainsi, d'acquérir une connaissance de variation de forme dans l'espace, en 10 traitant de façon individuelle chaque cellule selon un procédé en flux continu. Il devient ainsi possible d'acquérir des données spécifiques pour chaque cellule ou particule d'une population et d'établir ainsi une distribution des propriétés de visco-élasticité.

Un autre avantage de l'objet de l'invention réside dans 15 le fait que l'analyseur d'image 10 possède, compte tenu de sa conception, une large bande passante de l'ultraviolet en passant par le visible jusqu'à l'infrarouge, ainsi qu'une grande linéarité de réponse.

L'appareil selon l'invention trouve une application préférée à la distribution rhéologique des globules rouges du sang. Dans 20 une telle application, l'appareil peut être réalisé en conférant à ses éléments constitutifs les caractéristiques suivantes :

- diamètre de la section utile	
du capillaire 3	supérieure à $20\mu$
- diamètre du passage rétréci	$5\mu$
- longueur de la portion rétrécie	$50\mu$
- longueur du passage rétréci	$15\mu$
- longueur axiale du miroir 1	92 mm
- fonction parabolique du miroir 1	$f = 10,2$ mm
- <u>n</u> =	400
- diamètre utile des guides 14	0,66 mm
- puissance du laser	2 mW
- longueur d'onde du faisceau laser	632,8 nm
- concentration de la suspension	de l'ordre de 1 %
- fluide porteur de la suspension	isotonique isoPh
- vitesse de rotation de l'analyseur	25 tours/s
- linéarité du dispositif	10 000/1

REVENDICATIONS

1 - Appareil de mesure en flux continu des propriétés individuelles de particules ou cellules, du type comprenant un réflecteur, un conduit capillaire transparent passant par le foyer du miroir et assurant le cheminement individuel de cellules, un moyen d'irradiation, selon une direction normale à l'axe du conduit, de la partie dudit conduit passant au foyer, un masque n'occultant que les rayons diffractés non réfléchis, une cellule photosensible recevant les rayons diffractés réfléchis et des moyens de traitement des signaux fournis par la cellule,

caractérisé en ce que, dans son application à la mesure des propriétés de visco-élasticité individuelle de cellules déformables, il comporte :

- un réflecteur (1) constitué par un miroir paraboloidal,
- 15 - un conduit capillaire (3) transparent de section constante possédant, dans sa partie traversant le foyer (F), une modification de section (3a) incluant, selon le sens de circulation des cellules, un convergent-divergent,
- 20 - un moyen (4) de mise en circulation forcée dans le conduit de cellules déformables en suspension,
- un analyseur d'images comprenant :
  - . un récepteur optique mosaïque plan (12),
  - . un anamorphoseur (17),
  - . et un détecteur tournant (18) associé à un seul capteur photoélectrique (22),
  - . et une chaîne (11) de traitement des signaux délivrés par l'analyseur.

2 - Appareil selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'analyseur d'images (10) comprend un anamorphoseur (17) constitué par n guides (14) dont les têtes constituent des points de captation (13) du récepteur mosaïque plan (12) et dont les autres extrémités sont disposées en forme de piste annulaire (15) pour coopérer avec le détecteur tournant (18).

35 3 - Appareil selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'analyseur d'images (10) comprend un récepteur optique mosaïque

plan (12) dont le plan est perpendiculaire à l'axe (x-x') du réflecteur (1).

4 - Appareil selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'analyseur d'images (10) comprend un support tournant (18) placé sur l'axe de la piste (15) et comportant un guide optique (21) dont la tête explore successivement les sections des guides optiques (14) de l'anamorphoseur et dont l'autre extrémité est reliée au capteur photoélectrique (22).

5 5 - Appareil selon la revendication 1, caractérisé en ce que le conduit capillaire comporte une portion rétrécie (3a) comprenant un convergent (3a<sub>1</sub>), un passage rétréci (3a<sub>2</sub>) de section constante et un divergent (3a<sub>3</sub>).

6 - Appareil selon la revendication 1 ou 5, caractérisé en ce qu'il comprend un moyen d'irradiation (6) produisant, au foyer du miroir, une tache lumineuse d'un diamètre de l'ordre de celui du conduit capillaire.

1/1

