

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑭ Date de dépôt : 18.10.90.

⑮ Priorité : 19.10.89 NL 894161.

⑯ Date de la mise à disposition du public de la demande : 26.04.91 Bulletin 91/17.

⑰ Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Le rapport de recherche n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

⑱ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑴ Demandeur(s) : *Société dite: SKATRON A/S — NO.*

⑵ Inventeur(s) : Steen Harald.

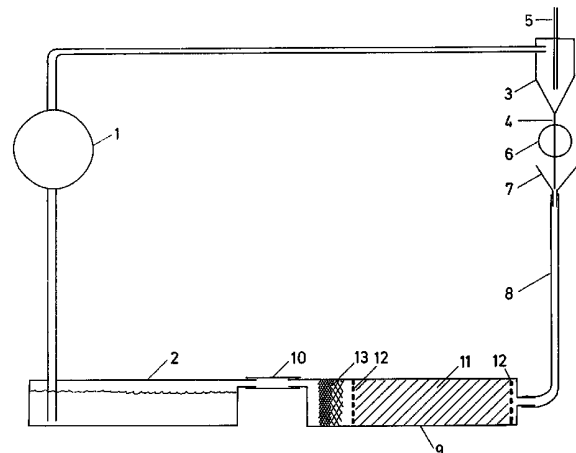
⑶ Titulaire(s) :

⑷ Mandataire : Cabinet Netter.

⑸ Système pour purifier et recycler l'eau passant à travers la chambre d'écoulement d'un cytomètre à écoulement.

⑹ Système fluide pour cytomètres à écoulement.

Système pour filtrer, purifier et recycler l'eau dans des cytomètres à écoulement. Après avoir traversé la chambre d'écoulement (3) du cytomètre à écoulement, l'eau, contenant l'échantillon, passe à travers des filtres physiques (13) et chimiques (11) pour retirer les cellules, les débris de cellules et d'autres matières en particules, ainsi que les pigments, avant que l'eau soit recyclée à travers l'instrument en tant que fluide porteur pour des échantillons ultérieurs.



La présente invention concerne un système pour purifier  
et recycler l'eau passant à travers la chambre d'écoulement  
5 d'un cytomètre à écoulement.

Un cytomètre à écoulement est un instrument pour mesurer  
la fluorescence et la dispersion de la lumière de cellules  
biologiques individuelles en grand nombre. La mesure est  
10 effectuée tandis que les cellules passent une par une à  
travers le foyer d'une source de lumière intense qui excite  
les pigments fluorescents dans les cellules. Ainsi, l'inten-  
sité de la fluorescence est une mesure du constituant parti-  
culier de la cellule qui lie le pigment fluorescent. L'intensité  
15 de la lumière dispersée est principalement une mesure de  
la dimension de la cellule. La fluorescence et la lumière  
dispersée sont recueillies par une optique appropriée et  
détectées au moyen de tubes photomultiplicateurs séparés  
ou autres détecteurs photosensibles. Les détecteurs transfor-  
20 ment les impulsions lumineuses en impulsions électriques  
équivalentes, qui sont ensuite numérisées, stockées et classées  
dans un ordinateur.

Les cellules sont transportées à travers le foyer d'excita-  
25 tion par un écoulement laminaire d'eau ayant une section  
transversale de dimensions microscopiques. Cette eau de  
transport, qui est couramment appelée "gaine fluide", est  
amenée dans une chambre d'écoulement conique sous une pression  
de l'ordre de 1 kg/cm<sup>2</sup>. L'orifice de la chambre d'écoulement,  
30 qui a de façon caractéristique une section transversale  
de l'ordre de 100  $\mu$ m, conduit, soit dans l'air où l'eau  
forme un jet cylindrique, soit dans un tube passant par  
le foyer d'excitation. L'échantillon, qui est habituellement  
une suspension de cellules, est introduit dans la chambre  
35 d'écoulement par un tube disposé dans le centre de la chambre  
d'écoulement. De ce fait, les cellules sont confinées au  
noyau central de l'écoulement passant par le foyer d'excita-  
tion.

La quantité de la gaine fluide passant à travers la chambre d'écoulement est d'environ 10 ml/min, ce qui signifie qu'un cytomètre à écoulement consomme de l'ordre de 5 litres par jour. De ce fait, la plupart des cytomètres à écoulement  
5 ont un réservoir d'eau d'environ ce volume. Ce réservoir augmente notablement le poids et le volume de l'instrument. Spécialement pour les instruments prévus pour être utilisés sur le terrain, il est important de réduire ce volume autant que faire se peut. Dans les instruments conçus pour être  
10 utilisés dans des vaisseaux spatiaux, une telle réduction est bien entendu essentielle. Il existe une demande croissante pour des instruments à utiliser sur le terrain, qui puissent fonctionner sans surveillance pendant de longues périodes.

15 L'eau utilisée comme gaine fluide doit avoir une grande pureté. On utilise habituellement de l'eau distillée, qui passe ensuite à travers un filtre ayant une dimension de pores de 0,2  $\mu$ m. Une eau de cette qualité n'est pas aisément disponible dans tous les laboratoires utilisant des cytomètres  
20 à écoulement.

Un autre problème rencontré dans l'utilisation de cytomètres à écoulement est que certains des pigments fluorescents utilisés pour colorer les cellules, et notamment les pigments  
25 utilisés pour colorer l'ADN, c'est-à-dire le matériau génétique, sont fortement mutagènes et/ou carcinogènes. L'eau usée en provenance de cytomètres à écoulement ne peut donc être évacuée dans les égouts publics, comme c'est actuellement le cas. D'autre part, il est coûteux d'évacuer des volumes  
30 d'eau aussi importants d'une manière plus responsable.

La présente invention résout ces problèmes en proposant une manière grâce à laquelle l'eau est filtrée et purifiée pour être réutilisée à nouveau. Ainsi, le volume d'eau total  
35 dans un cytomètre à écoulement peut être réduit de deux ordres de grandeur et le volume des eaux usées à évacuer est réduit en correspondance.

Le système selon l'invention se caractérise en ce qu'il comporte (a) une pompe entraînant l'eau d'un réservoir dans la chambre à écoulement et à travers le foyer d'excitation; (b) un filtre composite à travers lequel l'eau quittant  
5 le foyer au moyen d'un entonnoir et d'un tube revient dans le réservoir à travers un tube.

Selon une autre caractéristique du système, ce filtre composite contient un matériau chimiquement actif, qui absorbe  
10 les pigments utilisés pour colorer les cellules pour une cytométrie à écoulement et des filtres mécaniques qui retirent de l'eau les cellules et les autres matériaux en particules.

L'invention va maintenant être décrite en se reportant à  
15 la figure du dessin joint, illustrant une réalisation préférée, bien que non limitative de l'invention.

Le système comprend une pompe 1, laquelle aspire de l'eau d'un réservoir 2 pour l'envoyer sous pression constante  
20 à la chambre d'écoulement 3 d'un cytomètre à écoulement et qui produit ainsi le jet laminaire d'eau 4 qui transporte les cellules à travers le foyer d'excitation 6. La suspension de cellules est introduite dans l'écoulement par l'intermédiaire d'un mince tube 5 disposé dans l'axe de la chambre  
25 d'écoulement. Lorsque l'eau est passée à travers le foyer d'excitation 6, elle s'écoule dans un entonnoir 7 conduisant par un tube 8 à un filtre composite 9. Après avoir traversé ce filtre, l'eau revient par le tube 10 au réservoir 2.

30 Le filtre composite 9 a une double fonction : il retire de l'eau les cellules, les débris de cellules et d'autres matières en particules et il absorbe les pigments fluorescents de l'échantillon. Le filtre composite 9 peut avoir la forme d'un tube horizontal à travers lequel l'eau est  
35 entraînée par la pression exercée par le niveau de liquide dans le tube 8. La sortie du filtre 9 est disposée de telle manière qu'elle laisse s'échapper tout air contenu.

La partie principale du filtre 9 est remplie d'un matériau chimiquement actif 11, par exemple du charbon actif, qui est maintenu en place de part et d'autre par un fin réseau d'acier inoxydable 12. Afin d'enlever les matériaux en particules, y compris les particules de carbone, le filtre chimique 11 est suivi par plusieurs filtres mécaniques 13 ayant des dimensions de pores décroissantes dans la direction de l'écoulement. La plus petite dimension de pore peut de façon caractéristique être autour de 0,2  $\mu\text{m}$ .

10

Le filtre 9 est équipé de raccords à ses deux extrémités, de façon à pouvoir être aisément démonté à des fins de remplacement. Ainsi, une fois le filtre saturé de pigments et de matériaux en particules, il peut être jeté sans que son contenu soit exposé à l'environnement.

15

A titre d'exemple, un filtre composite, contenant environ 50 ml de charbon actif, absorbera une quantité de pigments correspondant à environ 10 000 échantillons de cellules caractéristiques. De ce fait, on peut utiliser un filtre pendant plusieurs mois avant de le remplacer. Le volume total de l'eau dans le système tout entier peut être environ 100 ml. Pour éviter l'infection et la croissance d'algues et d'autres micro-organismes dans le système, on peut ajouter à l'eau un biocide, par exemple un azide de sodium.

20

25

Revendications

1.- Système pour purifier et recycler l'eau passant à travers la chambre d'écoulement d'un cytomètre à écoulement, caractérisé en ce qu'il comporte (a) une pompe (1) entraînant l'eau d'un réservoir (2) dans la chambre d'écoulement (3) et à travers le foyer d'excitation (6); et (b) un filtre composite (9) à travers lequel l'eau quittant le foyer (6) au moyen d'un entonnoir (7) et d'un tube (8) revient dans ce réservoir (2) par un tube (10).

2.- Système selon la revendication 1, caractérisé en ce que le filtre composite (9) contient un matériau chimiquement actif (11) qui absorbe les pigments utilisés pour colorer les cellules à des fins de cytométrie à écoulement et des filtres mécaniques (13) qui retirent de l'eau les cellules et d'autres matériaux en particules.

