

12

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

21 Numéro de dépôt: **82810226.9**

51 Int. Cl.³: **B 01 L 3/14**

22 Date de dépôt: **26.05.82**

30 Priorité: **29.05.81 CH 3518/81**

71 Demandeur: **BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE, 7 route de Drize, CH-1227 Carouge/Genève (CH)**

43 Date de publication de la demande: **05.01.83**
Bulletin 83/1

72 Inventeur: **Ringrose, Anthony, 124 chemin de la Montagne, CH-1224 Chênes-Bougeries (CH)**

84 Etats contractants désignés: **AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE**

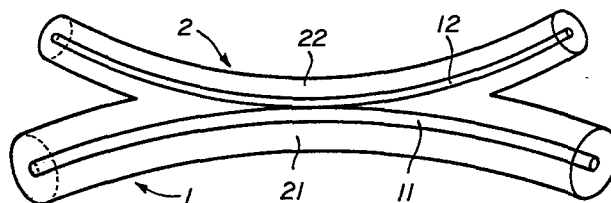
74 Mandataire: **Dousse, Blasco et al, 7, route de Drize, CH-1227 Carouge/Genève (CH)**

54 **Eprouvette de séparation par centrifugation d'un liquide physiologique et de collection d'au moins un des constituants de densité donnée.**

57 La présente invention concerne un dispositif de couplage de deux fibres optiques monomodes.

Ce dispositif comporte un premier tronçon (1) de fibre optique ayant un cœur (11) et une gaine (21) entourant ce cœur, et un second tronçon (2) ayant un cœur (12) et une gaine (22). Les deux tronçons ont été polis et assemblés, de telle manière que les deux cœurs (11) et (12) soient juxtaposés. Le cœur (11) a un rayon r_1 et le cœur (12) a un rayon r_2 . Les tronçons de fibres ont été choisis de telle manière que $r_1 \geq r_2$ et que $\Delta n_1 < \Delta n_2$, où Δn_1 représente la variation d'indice entre le cœur (11) et la gaine (21), et Δn_2 la variation d'indice entre le cœur (12) et la gaine (22).

Ce dispositif est utilisé pour effectuer du multiplexage et du démultiplexage pour une longueur d'onde de couplage λ_c donnée.



EP 0 069 053 A1

EPROUVETTE DE SEPARATION PAR CENTRIFUGATION

D'UN LIQUIDE PHYSIOLOGIQUE ET DE COLLECTION

D'AU MOINS UN DES CONSTITUANTS DE DENSITE DONNEE

La présente invention se rapporte à une éprouvette de séparation par centrifugation d'un liquide physiologique et de collection d'au moins un des constituants de densité donnée.

La centrifugation est une méthode bien connue pour la séparation et la purification de cellules, de virus et de particules cellulaires. Généralement cette séparation s'opère dans un milieu de centrifugation capable d'engendrer un gradient de densité continu ou discontinu lorsqu'il est soumis à la force centrifuge. De tels substances sont fabriquées notamment par Pharmacia Fine Chemicals AB à Uppsala en Suède et vendues sous les marques de commerce "Percoll" et "Ficoll-Paque".

En pratique le temps de centrifugation nécessaire à la séparation des particules, dans un milieu de viscosité donnée, est une fonction de la hauteur de la colonne de liquide dans le tube d'analyse.

Il est fréquent que les particules à séparer et à extraire forment, après centrifugation, une couche très mince, de l'ordre du millimètre ou même moins. Il s'ensuit que l'extraction de ces particules constitue une opération délicate qui requiert une grande minutie et de l'habileté. Cette opération est réalisée manuellement et son automatiser pose évidemment des problèmes au niveau de la sensibilité des moyens nécessaires pour détecter une couche aussi mince, ainsi qu'à celui des moyens capables d'aspirer exclusivement mais totalement, ces particules.

Comme on l'a vu précédemment, la réduction du diamètre de l'éprouvette conduirait à un allongement proportionnel du temps de centrifugation nécessaire pour obtenir la séparation. Or, une augmentation de l'épaisseur de la couche de particules devrait être très

sensible pour permettre d'effectuer la séparation et le prélèvement automatique de telles particules en utilisant des moyens de détection et de prélèvement simples.

5 Outre l'allongement du temps de centrifugation, la réduction du diamètre de l'éprouvette donne une moins bonne séparation qui se traduit par une contamination des globules rouges par des lymphocytes ainsi que par une augmentation du nombre de cellules mortes.

10 Il a déjà été proposé dans le brevet US 3.513.976 de former une éprouvette avec une partie intermédiaire de section sensiblement plus faible, dont le volume et la position relativement aux autres parties de l'éprouvette sont choisis pour correspondre à peu près à la portion de volume de leucocytes contenus dans un échantillon correspondant au volume de sang que peut contenir l'éprouvette ainsi qu'à la position de ces leucocytes après centrifugation de l'éprouvette
15 dont l'axe longitudinal est orienté radialement par rapport à l'axe de rotation. Il est prévu par ailleurs, d'ajuster finement le niveau des leucocytes en ajoutant du mercure dans le fond de l'éprouvette. La centrifugation dans une telle éprouvette suppose un transfert des composants de densités différentes à travers l'étranglement
20 de la partie intermédiaire. Si cet étranglement est important, la séparation par centrifugation peut s'avérer pratiquement irréalisable ou, pour le moins, nécessiter un allongement très considérable de la période de centrifugation.

25 Il a par ailleurs, été décrit par Harry Cutts en page 132 de son livre "Cell separation methods in Hematology" publié par Academic Press New York - Londres une installation comprenant une éprouvette dans laquelle est centrifugé le sang. Cette éprouvette est placée à l'intérieur d'un support dont le fond est muni d'un joint de néoprène. Une aiguille creuse est enfoncée à travers le fond du support, le joint néoprène et la paroi de l'éprouvette. Cette aiguille
30 est reliée à un réservoir de bromobenzène lui-même relié à un réservoir d'eau par une pompe péristaltique. En pompant l'eau dans le réservoir de bromobenzène, celui-ci est chassé dans l'éprouvette à travers l'aiguille creuse. On a fixé au sommet de l'éprouvette un
35 bouchon conique, dont le centre est traversé par un tube de petit diamètre, qui sert à récupérer les différentes phases liquides, au fur et à mesure qu'elles sont amenées à la sortie de ce tube de pe-

tit diamètre par le bromobenzène.

Il est évident qu'une telle solution ne permet pas d'envisager le traitement automatique de séries d'échantillons, comme ceci doit être fait dans des laboratoires bio-médicaux des hôpitaux et des centres de transfusion sanguine, tant les opérations nécessaires sont délicates. En outre, une telle solution nécessite au moins la vidange et la recharge périodique du réservoir de bromobenzène et le changement de l'aiguille creuse destinée à traverser le fond de l'éprouvette, dans la mesure où celle-ci vient en contact avec l'échantillon à analyser. Il est encore à signaler que le bouchon conique, rapporté dans l'ouverture de l'éprouvette, présente des arêtes vives qui sont susceptibles de créer des remous lors de l'écoulement du liquide à analyser et donc de mélanger les différentes phases séparées par la centrifugation.

Le but de la présente invention est de remédier au moins en partie aux inconvénients susmentionnés de façon à faciliter le prélèvement des particules séparées par centrifugation sans augmenter le temps nécessaire à la séparation ou affecter la qualité de cette séparation, par une solution qui se prête particulièrement bien à l'automatisation de ce prélèvement.

A cet effet, la présente invention a pour objet une éprouvette de séparation par centrifugation d'un liquide physiologique et de collection d'au moins un des constituants de densité donnée, présentant deux parties de sections circulaires différentes reliées par une partie de liaison dont la section passe progressivement de l'une à l'autre desdites sections. Cette éprouvette est caractérisée par le fait qu'elle est ouverte à ses deux extrémités, les sections de ces ouvertures correspondant auxdites sections respectives, l'ouverture présentant la plus grande de ces sections formant l'extrémité d'un cylindre de centrifugation qui reçoit un piston ajusté de façon étanche et l'autre de ces ouvertures, présentant la plus petite section, constituant l'ouverture par laquelle lesdits constituants séparés dans ledit cylindre peuvent être collectés, consécutivement au déplacement dudit piston en direction de cette ouverture.

L'avantage de l'éprouvette objet de l'invention réside essentiellement dans son autonomie, puisqu'elle comporte les éléments qui

permettent de séparer les constituants par centrifugation et ceux qui permettent d'amener ensuite ces constituants au niveau de l'ouverture de section réduite en vue de les collecter, cette ouverture de section réduite augmentant considérablement l'épaisseur des
5 différentes couches et réduisant leur interfaces en fonction du carré du rapport des rayons entre le corps cylindrique de l'éprouvette et l'ouverture de section réduite où se fait la collecte de ces constituants. Elle se prête donc bien à une installation automatique qui comporterait un poste de centrifugation et un poste de col-
10 lection des constituants après quoi l'éprouvette peut être jetée, vu le très faible coût qu'elle représente.

La figure unique du dessin annexé illustre, schématiquement et à titre d'exemple, une forme d'exécution d'un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé objet de l'invention.

15 Ce dispositif comporte une éprouvette 1 transparente présentant une partie la de diamètre supérieur à une partie lb, reliées par une portion ld dans laquelle la section varie progressivement. Le fond de la partie la est constitué par un piston 2 retenu par un rebord lc. Pour l'opération de prélèvement, le piston 2 est disposé coaxia-
20 lement à une tige d'entraînement à crémaillère 3 en prise avec un pignon 4 solidaire de l'arbre de sortie d'un moteur électrique 5 relié à un poste de commande 6. Ce poste de commande est relié à une cellule photo-électrique 7 disposée vis-à-vis d'une source de lumière 8, ces deux éléments se trouvant de part et d'autre de la partie
25 lb de l'éprouvette 1 à proximité de sa sortie et servant à détecter le niveau des différents produits issus de la séparation du liquide physiologique introduit dans l'éprouvette. Deux pointes de pipettes 9 et 10 sont introduites dans l'extrémité ouverte de l'éprouvette 1 et sont reliées au poste de commande 6. L'une de ces pipettes
30 est destinée à prélever les parties de liquide situées au-dessus de la couche de particules à prélever tandis que l'autre pipette recueillera ces particules.

Etant donné que les constituants du liquide centrifugé sont destinés à être recueillis au fur et à mesure de leur écoulement à tra-
35 vers l'ouverture de sortie de l'éprouvette, la longueur de la partie lb est sans importance et l'ouverture de sortie peut donc se situer directement au niveau où la partie ld a sa section la plus fai-

ble. Par ailleurs, le rebord lc destiné à retenir le piston 2 lors de la centrifugation n'est pas indispensable dans la mesure où, lors de la centrifugation, l'éprouvette peut être disposée dans un logement cylindrique orienté radialement à l'axe de centrifugation et dont le fond, tourné vers l'extérieur, sert lui-même à retenir le piston 2.

A titre d'exemple, le dispositif décrit peut être utilisé en vue de séparer et de prélever les lymphocytes d'un échantillon de sang d'un patient en vue de procéder à un test de mobilité électrophorétique macrophage basé sur la détection de la sensibilité des lymphocytes vis-à-vis d'un antigène issu d'une tumeur.

Le rapport entre l'épaisseur ou la hauteur de la couche de lymphocytes et sa section est une fonction inverse de la quatrième puissance du diamètre du tube. En effet, si h = hauteur de la couche, s = section transversale de cette couche, v = volume de la couche, $ra = h/s$, c = constante, f = fonction.

$$v = h \times s = c$$

$$h = \frac{c}{\pi r^2} \quad \text{donc } h = f\left(\frac{1}{r^2}\right)$$

$$s = \pi r^2 \quad \text{donc } s = fr^2$$

$$ra = \frac{h}{s} \quad \text{donc } ra = f\left(\frac{1}{r^2 \times r^2}\right)$$

$$\text{ou } ra = f\left(\frac{1}{r^4}\right)$$

En pratique, si, par exemple, le diamètre du tube diminue de 20 mm à 5 mm (un facteur de 4), la hauteur de la couche de lymphocytes augmente d'un facteur de 16, soit de l'ordre de 2 mm à 32 mm et le rapport h/s augmente d'un facteur de 256 ou passe de 0,006 à 1,54.

Pour réaliser cette séparation et ce prélèvement de lymphocytes selon l'invention, on procède tout d'abord selon la technique habituelle, à savoir, on dilue l'échantillon de sang du patient, par exemple, avec une solution de sels de Hank (Hank's BSS), on introduit ensuite 5 ml de Ficoll-Paque (marque déposée) qui est une so-

lution aqueuse de densité $1,077 \pm 0,001$ g/cm³ contenant 5,7 g de Ficoll 400 qui est un polymère synthétique de poids moléculaire élevé ($\bar{M}_w$ 400 000) de saccharose et d'épychlorohydrine facilement soluble dans l'eau et 9 g d'un agent anti-bactérien, le diatrizoate
5 de sodium, pour 100 ml, dans une éprouvette 1 de 20 ml. On additionne ensuite 10 ml de sang dilué dans l'éprouvette 1. On centrifuge cette éprouvette avec son axe incliné ou horizontal et le piston 2 dirigé vers l'extérieur, à 400 g durant 30 à 40 min.

A la suite de la séparation par centrifugation, quatre couches
10 se sont formées dans l'éprouvette. La couche supérieure comporte essentiellement le plasma, ensuite vient la mince couche comprenant des lymphocytes, puis le milieu de séparation formé dans cet exemple par le Ficoll-Paque et enfin les globules rouges et autres particules cellulaires. Ensuite, on dispose cette éprouvette 1 vis-à-vis
15 de la tige d'entraînement à crémaillère 3.

En poussant le piston 2 vers le haut, la tige d'entraînement à crémaillère 3 amène le sommet de la couche de plasma dans la partie rétrécie 1b de l'éprouvette 1. Lorsque le sommet de cette couche arrive vis-à-vis du détecteur photo-électrique 7, le poste de
20 commande 6 met en marche une des pipettes 9 et 10 qui est destinée à aspirer le plasma au fur et à mesure de son ascension dans la partie 1b de l'éprouvette. Dès que l'interface plasma lymphocyte arrive au niveau du détecteur photo-électrique 7, le poste de commande 6 arrête la pipette aspirant le plasma et met en marche l'autre pi-
25 pette qui aspire alors la couche de lymphocytes jusqu'à ce que le détecteur photo-électrique 7 détecte l'arrivée du bas de cette couche, moment auquel la pipette aspirant les lymphocytes est arrêtée ainsi que le moteur 5.

On procède alors au lavage des lymphocytes selon le processus
30 classique qui consiste à ajouter de nouveau un milieu électrophorétique macrophage, à centrifuger à 250 g pendant 10 minutes, à éliminer le liquide surnageant et à répéter cette opération autant de fois que nécessaire, par exemple trois fois.

Ensuite, les lymphocytes sont comptés, incubés avec l'antigène
35 ne et le test de mobilité électrophorétique macrophage susmentionné est réalisé.

Des essais comparatifs ont été réalisés avec le sang d'un don-

neur masculin en utilisant la méthode manuelle de prélèvement avec éprouvette classique et par ailleurs, en utilisant également la méthode de prélèvement manuelle mais avec l'éprouvette objet de la présente invention.

5 Un étalonnage des composants du sang à tester a été réalisé par différents comptages au microscope et en établissant la moyenne de ces comptages. Le comptage moyen des globules blancs basé sur six comptages distincts a donné 6650 cellules/mm³ ou $6,65 \times 10^6$ /ml. On a ensuite déterminé le taux moyen de lymphocytes à l'aide de trois
10 comptages, ce qui a donné 52% de lymphocytes soit $6,65 \times 52\% \times 10^6$ /ml = $3,46 \times 10^6$.

Ensuite, on a procédé à la collection des lymphocytes à l'aide de l'éprouvette objet de l'invention, en utilisant un échantillon de 10 ml de sang dilué à 50% dans une solution de sels de Hank
15 (Hank's BSS) et traité préalablement à l'héparine contre la coagulation. On a placé ces 10 ml dans une éprouvette dont le corps la a 20,3 mm de diamètre et l'ouverture de sortie de la partie lb 8 mm en ajoutant 5 ml de Ficoll-Paque (marque déposée). On a placé cette éprouvette dans un support cylindrique dont le fond présente une
20 ouverture de diamètre inférieur à celui du piston 2 et on a centrifugé cet échantillon à 400 g pendant 35 minutes.

Ensuite, on a placé l'éprouvette sur un appareil muni d'une tige d'entraînement à crémaillère 3, mais la collecte a été réalisée manuellement au niveau de l'ouverture de sortie de l'éprouvette. On
25 a constaté que le déplacement de la couche de lymphocytes est obtenu avec une remarquable stabilité de ses interfaces.

Les résultats obtenus sont $3,07 \times 10^6$ /ml de globules blancs total dont 92% de lymphocytes soit un rendement de $3,07 \times 92/3,46 = 81,6\%$ par rapport au comptage de référence, avec moins de 2% de cel-
30 lules mortes.

Le même test réalisé avec une éprouvette classique a donné $2,4 \times 10^6$ /ml de globules blancs total dont 82% de lymphocytes soit un rendement de $2,4 \times 82/3,46 = 56,8\%$ et environ 1% de cellules mortes.

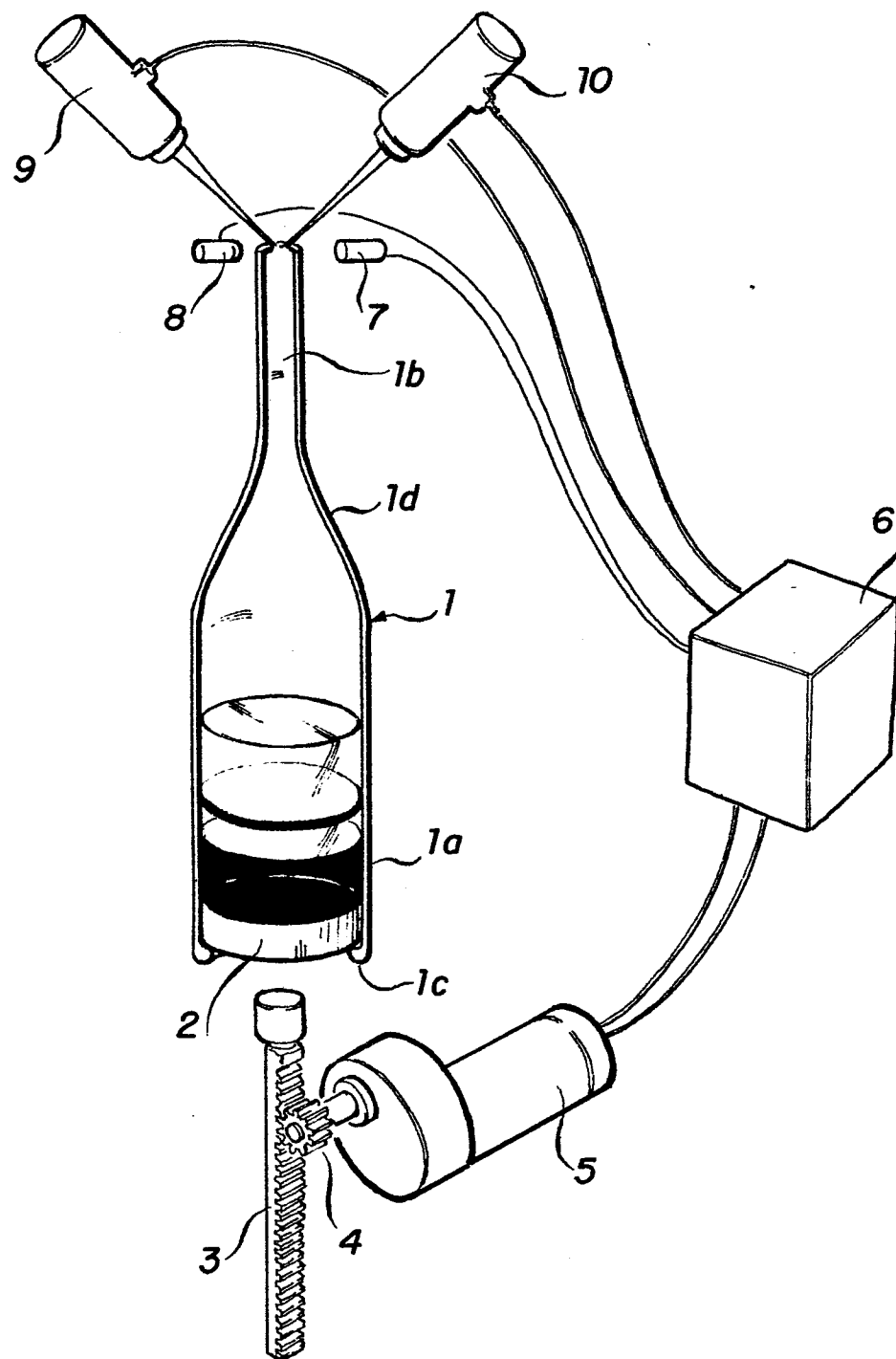
A titre indicatif, le fabricant du Ficoll-Paque, les laboratoi-
35 res Pharmacia Fine Chemicals AB, indique un rendement normal de 50% + 15%.

On constate que l'éprouvette objet de l'invention permet d'ob-

RE V E N D I C A T I O N

Eprouvette de séparation par centrifugation d'un liquide physiologique et de collection d'au moins un des constituants de densité donnée, présentant deux parties de sections circulaires différentes reliées par une partie de liaison dont la section passe progressivement de l'une à l'autre desdites sections, caractérisée par le fait qu'elle est ouverte à ses deux extrémités, les sections de ces ouvertures correspondant auxdites sections respectives, l'ouverture présentant la plus grande de ces sections formant l'extrémité d'un cylindre de centrifugation qui reçoit un piston ajusté de façon étanche et l'autre de ces ouvertures présentant la plus petite section, constituant l'ouverture par laquelle lesdits constituants séparés dans ledit cylindre peuvent être collectés, consécutivement au déplacement dudit piston en direction de cette ouverture.

1/1





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0069053

Numéro de la demande

EP 82 81 0226

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. ³)
X	US-A-3 513 976 (JAMES) *Colonne 3, lignes 33-45*	1	B 01 L 3/14
A	US-A-4 040 959 (BERMAN)		
A	DE-B-2 343 987 (SARSTEDT KUNSTSTOFF SPRITZGUSSWERK)		
A	DE-C- 608 010 (FISCHER)		
A	FR-A-2 314 486 (ICL/SCIENTIFIC)		
A	GB-A-1 443 524 (MERTEN)		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. ³)
			B 01 L
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 06-09-1982	Examineur LAMMINEUR P.C.G.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	