

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

⑰

**N° 81 02866**

---

⑤④ Procédé de mise en évidence des antigènes de groupe sanguin A, B, H sur des cellules humaines en milieu liquide.

⑤① Classification internationale (Int. Cl. 3) : G 01 N 33/58 // A 61 B 10/00.

②② Date de dépôt ..... 13 février 1981.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④① Date de la mise à la disposition du  
public de la demande ..... B.O.P.I. — « Listes » n° 33 du 20-8-1982.

---

⑦① Déposant : FELLA Christian Paul et HAMMOU Jean-Claude, résidant en France.

⑦② Invention de : Christian Paul Fella et Jean-Claude Hammou.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Cabinet Barnay  
80, rue Saint-Lazare, 75009 Paris.

La présente invention concerne un procédé de mise en évidence des antigènes de groupe sanguin A,B,H sur des cellules humaines en milieu liquide.

Ce procédé vise à mettre en évidence les anti-  
5 gènes de groupe sanguin A,B,H, sur des cellules humaines épithéliales recueillies soit dans les humeurs (urine, liquide d'ascite, liquide pleural...), soit de cellules recueillies après prélèvement par différents procédés :

- Cellules d'un frottis vaginal mise en suspension  
10 dans un milieu adéquat,
- cellules du col utérin mise en suspension dans un milieu adéquat,
- cellules de lavage bronchique recueillies après bronchoscopie,
- 15 - cellules d'expectoration mise en suspension dans un milieu adéquat.

Le procédé selon l'invention se caractérise par le fait qu'on place un prélèvement de cellules dans une solution d'un milieu fixateur tel que l'éthanol dont  
20 le pH est stabilisé entre 7 et 7,4 par un tampon approprié (par exemple de type PBS), puis on centrifuge la suspension cellulaire ainsi obtenue de façon à former un culot cellulaire que l'on place ensuite dans un milieu comprenant à la fois un tampon approprié à un pH de 7 à 7,4 et un  
25 détergent non ionique connu en soi, de façon à former une deuxième suspension cellulaire que l'on centrifuge pour constituer un deuxième culot cellulaire après quoi on ajoute à ce deuxième culot cellulaire un antisérum spécifique humain d'au moins un antigène A, ou B ou O(H) marqué  
30 par une substance fluorescente telle que par exemple fluorescéine ou Rhodamine, après quoi on lave en milieu tamponné à pH compris entre 7 et 7,4, pour éliminer l'antisérum non fixé et l'on effectue une excitation susceptible de provoquer la fluorescence de la substance  
35 marquant l'antisérum, et l'on décèle la présence ou l'absence de fluorescence traduisant la fixation d'antisérum sur au moins un site antigénique.

L'excitation et la détection de la fluorescence

peuvent être effectuées dans un appareil d'un type connu, appelé trieur-cellulaire ("cell Sorter").

L'invention prévoit en outre que l'antisérum peut être monospécifique d'un seul antigène A ou B ou O(H).

5 Dans une variante, on peut opérer de façon telle qu'après addition de l'antisérum on ajoute une petite quantité de teinture histologique connue sous le nom de bleu EVANS, on maintient un pH compris entre 7 et 7,4, on lave et l'on filtre, toujours sous le même pH, en rete-  
10 nant les particules supérieures à 5  $\mu$ m que l'on place sur un montage microscopique, et que l'on examine sur microscope à fluorescence.

Dans une première phase, les cellules sont recueillies dans une solution comportant 50% d'ETHANOL  
15 qui sert de milieu fixateur avec un milieu tampon de type PBS (tampon phosphate) représentant les 50% restants.

Dans une deuxième phase, on centrifuge la suspension cellulaire ainsi obtenue (par exemple, 5 minutes  
20 à 5000 tours minute). On récupère le culot cellulaire dans un milieu comprenant un tampon Phosphate de type PBS (90%) associé à un détergent non ionique (10%) par exemple un produit commercialisé sous le nom de TWEEN fait parfaitement l'affaire.

Dans une troisième phase, on centrifuge à  
25 nouveau la suspension cellulaire ainsi obtenue. On récupère le culot dans lequel on ajoute à quantité égale au culot l'antisérum marqué. Il s'agit d'un antisérum marqué par une substance fluorescente (FLUORESCÉINE ou RHODAMINE par exemple).

30 La spécificité de ce sérum sera dirigée soit contre l'antigène A de groupe sanguin, soit contre l'antigène B, soit contre l'antigène A et l'antigène B dans le même sérum, soit contre l'antigène H de groupe sanguin. Si les cellules du culot cellulaire recueillies chez le  
35 patient sont du groupe A par exemple, l'antisérum utilisé sera un antisérum de spécificité anti-A. Il en est de même pour les autres groupes sanguins B, AB, O.

Il existe une possibilité de rechercher

l'antigène de groupe sanguin A, B, AB, O à la surface des cellules dans la préparation définie plus haut sans connaître le groupe sanguin du patient d'où proviennent les cellules. En effet, on peut réaliser un sérum polyvalent

5 ayant plusieurs spécificités en mélangeant à part égale chaque antisérum (de spécificité anti A, anti B, de spécificité anti H). On a - - - donc ainsi réuni dans une seule

préparation plusieurs antisérums recouvrants toutes les spécificités de groupe sanguin A, B ou O(H).

10 Il existe deux possibilités de lecture suivant les moyens mis en oeuvre. Soit lecture en microscope optique avec un microscope à fluorescence. Soit lecture par un appareil de type CELL SORTER (appareil automatique à analyser et à trier les cellules).

15 Dans le cas où l'on veut réaliser une lecture par microscope optique par fluorescence :

- dans ce cas là, on rajoute à l'antisérum utilisé quel qu'il soit, soit un antisérum monospécifique (ayant soit la spécificité anti A, soit la spécificité anti B,

20 soit la spécificité anti H) , soit un sérum polyspécifique ayant donc plusieurs spécificités (anti A + anti B + anti H).

On rajoute à cet antisérum un colorant, le BLEU EVANS, après quoi on fait une centrifugation qui servira de lavage dans un tampon de type PBS. On remet ensuite en

25 suspension dans 5 cm<sup>3</sup> d'un tampon phosphate (PBS) dans une seringue et on filtre sur millipore. On fait ensuite un montage du millipore - - - - -

- - - - en glycérol sur coupe histologique. On fait ensuite une lecture en microscope à fluorescence.

30 La deuxième possibilité de lecture est celle donnée par un appareil de type "Cell Sorter" (appareil automatique connu pour analyser et trier les cellules). Après application de l'antisérum marqué soit monospécifique (anti A ou anti B, ou anti H), soit polyspécifique

35 (anti A + anti B + anti H). Dans ce cas, il est avantageux d'utiliser un antisérum polyvalent contenant plusieurs antisérums.

La suspension cellulaire réalisée plus haut, est

alors centrifugée (dans un tampon phosphate de type PBS). Le culot cellulaire recueilli est à nouveau mis en suspension dans un tampon de type PBS et l'échantillonnage est passé à la machine (Cell Sorter).

5 Il existe une possibilité de double marquage des cellules en suspension. En effet, au temps d'application de l'antisérum marqué sur les cellules, la suspension cellulaire peut être séparée en deux fractions avant le contact avec l'antisérum.

10 La première fraction est mise en contact avec l'antisérum soit monospécifique, soit polyspécifique qui peut être marquée par une substance fluorescente de type FLUORESCÉINE. La deuxième fraction, est mise en contact avec un antisérum marqué qui n'a pas la spécificité A, B  
15 ou H mais une autre spécificité (par exemple un antisérum dirigé contre un autre antigène de la membrane cellulaire); cet antisérum peut être également dirigé contre un antigène se trouvant dans le cytoplasme (ou sur le noyau de la cellule).

20 Cet antisérum marquant la deuxième fraction cellulaire sera marqué avec une substance fluorescente différente, par exemple la RHODAMINE. La lecture pourra se faire soit avec le microscope optique à fluorescence, soit avec une machine de type Cell Sorter.

REVENDICATIONS

1.- Procédé de mise en évidence des antigènes de groupe sanguin A, B, H sur des cellules humaines en milieu liquide, caractérisé par le fait qu'on place un pré-  
5 lèvement de cellules dans une solution d'un milieu fixateur tel que l'éthanol dont le pH est stabilisé entre 7 et 7,4 par un tampon approprié (par exemple de type PBS, puis on centrifuge la suspension cellulaire ainsi obtenue de façon à former un culot cellulaire que l'on place ensuite dans un  
10 milieu comprenant à la fois un tampon approprié à un pH de 7 à 7,4 et un détergent non ionique connu en soi, de façon à former une deuxième suspension cellulaire que l'on centrifuge pour constituer un deuxième culot cellulaire après quoi on ajoute à ce deuxième culot cellulaire un antisérum  
15 spécifique humain d'au moins un antigène A, ou B ou O(H) marqué par une substance fluorescente telle que par exemple fluorescéine ou Rhodamine, après quoi on lave en milieu tamponné à pH compris entre 7 et 7,4, pour éliminer l'anti-  
20 sérum non fixé et l'on effectue une excitation susceptible de provoquer la fluorescence de la substance marquant l'anti-  
sérum, et l'on décèle la présence ou l'absence de fluorescence traduisant la fixation d'antisérum sur au moins un site antigénique.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé  
25 par le fait que l'excitation et la détection de la fluorescence sont effectuées dans un appareil d'un type connu, appelé trieur-cellulaire ("Cell Sorter").

3.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait que l'antisérum est  
30 monospécifique d'un seul antigène A ou B ou O(H).

4.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait qu'après addition de l'antisérum on ajoute une petite quantité de teinture histologique connue sous le nom de bleu EVANS, on maintient  
35 un pH compris entre 7 et 7,4, on lave et l'on filtre, toujours sous le même pH, en retenant les particules supérieures à 5  $\mu$ m que l'on place sur un montage microscopique, et que l'on examine sur microscope à fluorescence.