(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) **N° de publication :** ***2 963 108***

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **10 55973**

(51) Int Cl[8] : ***G 01 N 33/543*** *(2006.01), G 01 N 33/80*

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 21.07.10.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 27.01.12 Bulletin 12/04.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire :** *Se reporter à la fin du présent fascicule*

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

(71) **Demandeur(s) :** *DIAGAST Société par actions simplifiée* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** FAUCONNIER LAURENCE, BARBREAU YVES, BOULET ARNAUD et ZAKHOUR MAHA.

(73) **Titulaire(s) :** DIAGAST Société par actions simplifiée.

(74) **Mandataire(s) :** CABINET REGIMBEAU.

(54) PROCEDE MAGNETIQUE D'IMMUNODIAGNOSTIC ET KIT POUR LA MISE EN EVIDENCE DE COMPLEXE ANTICORPS/ANTIGENE DE GROUPE/PHENOTYPE SANGUIN.

(57) La présente invention concerne un procédé magnétique d'immunodiagnostic pour la mise en évidence de complexe anticorps/antigène de groupe et de phénotype sanguin. Un tel procédé a pour application la recherche et/ou l'identification d'anticorps anti-antigène ou d'antigène de groupe sanguin ou de phénotype sanguin. Ce procédé met en oeuvre une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-glycophorine A capables de magnétiser de manière spécifique des érythrocytes. L'invention comprend également un kit permettant de réaliser un tel procédé.

FR 2 963 108 - A1

La présente invention concerne un procédé magnétique d'immunodiagnostic pour la mise en évidence de complexe anticorps/antigène de groupe et de phénotype sanguin. Un tel procédé a pour application la recherche et/ou l'identification d'anticorps anti-antigène ou d'antigène de groupe sanguin ou de phénotype sanguin. Ce procédé met en œuvre une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-glycophorine A capables de reconnaître et de magnétiser de manière spécifique des érythrocytes. L'invention comprend également un kit permettant de réaliser un tel procédé.

La transfusion sanguine consiste de nos jours à administrer par voie intraveineuse des préparations de concentré de globules rouges (concentrés globulaires) obtenus à partir de sang de donneurs.

Lors d'une transfusion sanguine, le risque premier est lié à la possibilité de réunir dans l'organisme du receveur (la personne transfusée), un anticorps et son antigène érythrocytaire. On trouve en effet à la surface des érythrocytes, appelés encore globules rouges ou hématies, des antigènes membranaires érythrocytaires, notamment des antigènes de groupe (ou système) sanguin, capables d'être reconnus par le système immunitaire et déclencher une réponse immune.

Les globules rouges du donneur sont dits compatibles avec le sang du receveur si le receveur ne présente pas d'anticorps circulants dirigés contre un antigène érythrocytaire du donneur.

Parmi l'ensemble des variants antigéniques d'un antigène membranaire érythrocytaire constituant les groupes sanguins, plus de vingt systèmes antigéniques érythrocytaires chez l'Homme ont été identifiés à ce jour : système ABO avec les antigènes A ou B, système Rhésus avec les antigènes D, C, E, c et e, système Kell avec les antigènes K ou k, système Duffy (Fya, Fyb), système Kidd (Jka, Jkb), système MNS (M, N, S et s) ou encore d'autres systèmes moins fréquemment recherchés en pratique et existant aussi tels que Lewis, Lutheran, etc..

Les individus présentant une même association d'antigènes érythrocytaires appartiennent à un même groupe sanguin érythrocytaire. Les groupes sanguins sont d'autant plus complexes et nombreux que l'on utilise plusieurs systèmes antigéniques.

En dehors de situation pathologique, telle que dans le cas de maladie auto-immune, le sérum d'un individu peut contenir deux types d'anticorps dirigés contre des antigènes érythrocytaires :

a/ les anticorps dits réguliers et dirigés contre les antigènes du système ABO (par exemple anticorps anti-A chez l'individu de groupe B). Il s'agit d'immunoglobulines de type IgM qui sont capables d'agglutiner les globules rouges in vitro. Ce phénomène est mis à profit pour déterminer le groupe ABO d'un individu par les épreuves de Beth-Vincent et Simonin, l'épreuve de Beth-Vincent permettant de déterminer les antigènes portés par ses globules rouges (phénotype antigénique) et l'épreuve de Simonin permettant de réaliser l'étude complémentaire, c'est à dire de déterminer les anticorps anti-A et/ou anti-B circulants, présents dans le sérum de l'individu.

Dans l'épreuve de Beth-Vincent, les globules rouges de l'individu sont mis en présence de sérums tests, ou anticorps tests, possédant chacun un type d'anticorps précis, dirigé contre un antigène du système ABO. Il s'agit donc d'un test d'agglutination des globules rouges avec des sérums tests.

Dans l'épreuve de Simonin, appelée encore contre-épreuve, le sérum de l'individu, contenant ses anticorps circulants, est mis en présence de globules rouge tests ou érythrocytes tests, appartenant chacun à un groupe antigénique précis du système ABO. Il s'agit donc d'un test d'agglutination du sérum avec des globules rouge tests.

b/ les anticorps dit irréguliers (ou immuns) dont la présence dans le sérum ou plasma est facultative et qui sont dirigés contre des antigènes des systèmes non ABO. Il s'agit le plus souvent d'IgG, apparaissant à l'occasion d'une stimulation antigénique par des globules rouge étrangers, par exemple suite à une immunisation contre un ou plusieurs antigènes lors d'une transfusion sanguine ou encore lors d'une grossesse par réaction immunitaire maternelle dirigée contre les antigènes érythrocytaires fœtaux n'appartenant pas au groupe sanguin maternel, notamment lors de l'accouchement.

La recherche de ces anticorps dits irréguliers est appelée recherche d'Agglutinine Irrégulière (RAI). Ce test est utilisé pour détecter la présence ou non dans le sang d'un individu d'IgG dirigées contre divers antigènes érythrocytaires. Pour cela, on cherche à mettre en évidence la fixation de ces IgG sur des globules rouge tests dont les antigènes sont connus. On procède en parallèle sur de nombreux types de globules rouges, la comparaison des résultats permettant d'identifier l'IgG ou les IgG présentes.

Le risque est plus important pour les antigènes les plus immunogènes comme le Rhésus D, mais aussi les autres antigènes du système rhésus (E>c>e>C), l'antigène Kell (K), les antigènes Duffy (Fya, Fyb), les antigènes Kidd (Jka, Jkb), etc..

En pratique, on ne peut tenir compte de tous ces antigènes pour réaliser une transfusion faute de quoi on ne disposerait jamais du bon groupe sanguin au bon moment, d'autant moins que certaines associations antigéniques sont très rares. La transfusion standard ne tient compte que du groupe dans le système ABO plus le Rhésus D (Rh+ ou Rh-). Dans les situations à risque d'apparition d'une agglutinine irrégulière, on tient compte d'un certain nombre d'autres antigènes, notamment les Rhésus C et E et le Kell, voire d'autres systèmes antigéniques. Il s'agira alors pour ces situations à risques de respecter la compatibilité du groupe sanguin du donneur avec celui du sang du receveur en tenant compte de la présence ou du risque d'apparition de ces agglutinines irrégulières.

Ainsi chez un patient receveur porteur d'anticorps irréguliers anti-érythrocytaires ou dans une situation à risque comme notamment chez les patients polytransfusés ne possédant pas d'anticorps irréguliers anti-érythrocytaires et chez la femme enceinte, il est indispensable de sélectionner les unités de concentrés érythrocytaires qui vont lui être transfusées de telle sorte que les globules rouges du donneur devront être dépourvus des antigènes contre lesquels les anticorps du receveur sont dirigés ou susceptibles d'apparaître. Cette épreuve de compatibilité est obligatoire chez ces patients et de manière préventive chez tous les receveurs avant l'administration des concentrés érythrocytaires en effectuant une épreuve de compatibilité directe avec les hématies du donneur en présence du sérum ou plasma du receveur. Aucune réaction d'agglutination et/ou de lyse dans les techniques utilisées pour la RAI ne doit être observée.

En pratique clinique transfusionnelle, le phénotypage érythrocytaire, qui correspond à la recherche et à l'identification des antigènes de groupe sanguin à la surface des hématies (à l'exception du système ABO où l'on recherche en outre la présence des anticorps réguliers correspondants) concerne aussi bien le receveur que le donneur.

A l'échelon du receveur et du donneur, trois niveaux de phénotype érythrocytaire existent afin de mettre à disposition du receveur des concentrés érythrocytaires compatibles en fonction des situations à risque :

- la détermination du groupage ABO et Rhésus standard (présence ou absence de l'antigène D) ;
- la détermination du phénotype Rhésus Kell (présence ou absence des antigènes C, E, c, e, et K) ; et
- la détermination du phénotype étendu (ou élargi), c'est-à-dire présence des antigènes du système Duffy (Fya, Fyb), du système Kidd (Jka, Jkb) et du système MNSs (antigènes S et s) d'autres antigènes pouvant être en outre recherchés selon la nature du risque et/ou de l'anticorps irrégulier mis en évidence dans le sérum du receveur.

Les techniques habituellement utilisées pour le phénotypage consistent, en général, à rechercher à l'aide de sérums tests contenant les anticorps appropriés la présence ou l'absence de l'antigène recherché. De préférence, ces anticorps contenus dans ces sérums tests sont de nature agglutinante (IgM ou IgA) ce qui permet d'obtenir une agglutination totale ou partielle des érythrocytes à phénotyper lorsque ces derniers portent l'antigène correspondant à l'anticorps présent dans le sérum test. Néanmoins, il est possible d'utiliser des anticorps tests non agglutinants (de type IgG), l'agglutination étant provoquée au moyen d'une anti-immunoglobuline et visible notamment après une étape de centrifugation et remise en suspension du culot obtenu (technique dite de Coombs indirect). Il est également possible d'utiliser des anticorps tests non agglutinants où la présence de ces anticorps tests fixés sur le globule rouge est visualisée au moyen d'une anti-immunoglobuline fixée sur une phase solide (technique dite d'immuno-adhérence). La lecture du test pourra être réalisée à l'œil ou au moyen de lecteur approprié.

Pour la recherche et l'identification, dans le sérum ou plasma du patient à tester, d'anticorps anti-antigènes de groupe sanguin, réguliers pour le groupage ABO ou irréguliers dans le cadre de la RAI, on met en général en présence le sérum ou le plasma du patient avec des érythrocytes-tests (appelés aussi hématies- ou globules rouges-tests) d'antigénicité connue dans un certain nombre de systèmes de groupes sanguins (ABO, Rhésus, Kell, Duffy, Kidd, MNSs, ...). Pour la RAI, pour laquelle les anticorps

susceptibles d'être présents sont plutôt de types non agglutinants, les techniques utilisées sont de type Coombs indirect par agglutination au moyen d'une anti-immunoglobuline ou par immuno-adhérence sur une phase solide revêtue d'une anti-immunoglobuline.

Pour la RAI, on utilise dans une première étape un panel de globules rouges dit de dépistage (deux ou trois globules rouges de groupes différents choisis de façon à comporter le maximum d'antigènes d'importance transfusionnelle) permettant de détecter (mais pas d'identifier) la présence ou l'absence d'anticorps irréguliers. Lorsque le dépistage est positif, on réalise alors l'identification de la spécificité du ou des anticorps irréguliers présents au moyen d'un panel de globules rouge dit d'identification comportant en général 10 à 15, voire même 20 globules rouges différents, phénotypés dans la grande majorité des systèmes de groupes sanguins connus.

Dans le cas de l'épreuve de compatibilité (appelé aussi cross-match), les globules rouges du donneur sont mis en présence du sérum ou du plasma du receveur, on effectue en général une première étape de centrifugation, afin d'observer la présence éventuelle d'une agglutination liée à la présence dans le sérum du receveur d'anticorps réagissant avec les globules rouges du donneur (incompatibilité de type ABO ou anticorps irréguliers de type IgM ou IgA), dans le cas où cette première étape est négative, elle est suivie d'une recherche d'anticorps irréguliers au moyen d'une anti-immunoglobuline (technique de Coombs indirect).

Il existe un grand nombre de techniques utilisées pour le phénotypage ou la RAI dans le domaine de la transfusion sanguine, ces techniques pouvant être manuelles, sur plaque d'opaline, en tube ou en cupule de microplaque, ou bien complètement automatisées à l'aide d'un robot distributeur d'échantillons et de réactifs, d'agitateur, d'incubateur et de lecteur automatique dont les programmes sont adaptés aux techniques de mises en œuvre.

Parmi les techniques utilisées, on peut citer les techniques pour lesquelles la présence d'anticorps anti-antigène de groupe sanguin ou d'antigène de groupe sanguin est basée sur la mise en évidence d'une agglutination de globules rouges après centrifugation mettant en œuvre une mini colonne de filtration transparente (gel type « sephadex™ » ou microbilles) dont l'évasement à l'extrémité supérieure sert de

chambre d'incubation et dont le seuil de coupure choisi pour la colonne empêche les hématies agglutinées après centrifugation de traverser la colonne (brevet EP 0 194 212 ou EP 0 755 719).

La présente invention consiste en fait à une amélioration de la technique déposée dans le brevet WO 2007/051844, en ce sens qu'elle combine la magnétisation spécifique des hématies, grâce à des billes magnétiques couplées à un anticorps spécifique d'un antigène érythrocytaire, et un procédé de test sans lavage, utilisant une antiglobuline coatée au fond des puits d'une microplaque. Ce procédé allie une solution visqueuse qui sert de barrière filtrante aux anticorps libres non fixés aux hématies, et un diluant déposé sur cette barrière filtrante contenant des billes magnétiques couplées à un anticorps spécifique d'un antigène érythrocytaire. Pendant la phase d'incubation des hématies avec le sérum du patient ou du donneur, les hématies vont être magnétisées via un anticorps spécifique. Cette magnétisation permet de magnétiser n'importe quel globule rouge issu de n'importe quel milieu ou tampon et de s'affranchir de tous les éléments perturbateurs présents dans le sérum pendant la magnétisation.

Le principe de l'invention consiste à magnétiser de façon spécifique des globules rouges pour les rendre mobiles sous l'effet d'un champ magnétique et ainsi pouvoir réaliser toutes les étapes nécessaires à la mise en œuvre des tests d'immuno-hématologie. L'invention est relative au procédé de magnétisation des globules rouges de façon spécifique mais aussi à leur utilisation dans un kit permettant la réalisation des tests de groupage et phénotypage sanguin ainsi que la recherche d'anticorps irréguliers dans les tests de RAI et de compatibilité entre donneur et receveur ainsi que dans le test direct à l'antiglobuline.

La magnétisation spécifique des globules rouges consiste en la fixation de particules magnétiques sur les globules rouges via un anticorps monoclonal ou polyclonal, spécifique d'un antigène de groupe sanguin exprimé sur la membrane des globules rouges. Cet anticorps spécifique des antigènes de groupes sanguins est lui-même lié de façon covalente à une particule magnétique fonctionnalisée. Le choix de l'antigène, cible de reconnaissance de l'anticorps couplé aux billes magnétiques, s'est porté sur une protéine transmembranaire fortement exprimée à la surface des globules rouges humains, présente sans distinction

ethnique et non présente sous forme soluble dans le plasma humain. Ainsi, la protéine choisie comme cible est la protéine transmembranaire nommée la Glycophorine A.

La glycophorine A est la sialoglycoprotéine la plus représentée à la surface de la membrane des globules rouges, elle est présente sur tous les globules rouges de toutes les ethnies. Il n'existe aucune forme soluble de cette glycoprotéine. Le nombre de copie de cette sialoglycoprotéine a été estimé à environ $1x10^6$. Constituée d'une chaîne polypeptidique traversant la bicouche lipidique une seule fois, elle est divisée en trois domaines : un domaine extracellulaire de 131 acides aminés portant la partie N-terminale, un domaine transmembranaire hydrophobe constitué de 72 acides aminés et enfin un domaine intracellulaire portant la partie C- terminale et constitué de 23 acides aminés.

Le domaine extracellulaire de cette glycoprotéine est fortement glycosylé par 15 oligosaccharides de type O-glycans et par un oliggosaccharide de type N-glycan.

La glycophorine A est connue pour porter les antigènes M et N du groupe sanguin MNS. Ces 2 antigènes se différencient par un polymorphisme nucléotidique qui va donner lieu à un changement sur la chaîne polypeptidique de 2 acides aminés, le premier en position 1 et le second en position 5. Ce qui se traduit, pour un individu M positif, par la présence à la fois d'une serine en position 1 et d'une glycine en position 5, sur la chaîne polypeptidique. En revanche un individu exprimant l'antigène N présentera un acide aminé de type leucine en position 1, et un acide glutamique en position 5 de la chaîne polypeptidique.

Ces deux antigènes étant situés à proximité de la partie N-terminale de la protéine d'intérêt, l'anticorps monoclonal, utilisé doit avoir son épitope de reconnaissance dans la partie extracellulaire de la sialoglycoprotéine mais également à distance des 2 antigènes M et N.

Ainsi, l'anticorps monoclonal, dirigé contre la glycophorine A (anti-GPA), choisi pour être couplé aux billes magnétiques, est une Immunoglobuline murine de type IgG. Cet anticorps a été développé après immunisation de souris par des globules rouges humains de groupe A1. Il est dirigé contre les acides aminés 38 à 44 de la glycophorine A.

Cet anticorps monoclonal est ainsi couplé à des billes super-paramagnétiques de façon covalente. Ainsi fixé aux billes magnétiques, l'anticorps anti-GPA, pourra reconnaître l'antigène à la surface des érythrocytes, ainsi les hématies seront magnétisées, par l'intermédiaire de l'anticorps anti-GPA.

Ces hématies sensibilisées par les particules magnétiques couplées à un anticorps anti-érythrocyte, présentent alors la double propriété d'être attirées par un champ magnétique et également de posséder à leur surface les antigènes sanguins (groupe et phénotype). Elles pourront alors être utilisées comme support de réaction et vecteur de transport du couple antigène-anticorps dans un test d'analyse immunologique. (Figure 1).

On connaît déjà des procédés qui permettent de magnétiser des globules rouges de patients avec des particules ferromagnétiques.

Ainsi le brevet WO 2005/121805 utilise des particules ferromagnétiques de très petites tailles pour magnétiser des globules rouges, dans le but de les utiliser dans des tests de groupage, de phénotypage sanguin mais aussi de détection des anticorps irréguliers (tests RAI). La magnétisation des globules rouges se fait de façon non spécifique par contact direct des particules ferromagnétiques sur les globules rouges. Ce procédé permet de déplacer des globules rouges de patients sous l'effet d'un champ magnétique.

Par ailleurs, le brevet EP 0 230 768 qui décrit un procédé de co-agrégation de particules magnétiques capables de se lier à une substance contenue dans un échantillon au moyen de composés polycationiques ou ployanioniques en présence d'un champ magnétique. Ce document décrit en particulier la séparation du plasma d'un échantillon de sang total contenant des globules rouges dans lequel procédé, on ajoute séquentiellement dans un container placé sur un aimant l'échantillon de sang total et un ferrofluide (FeCl2/FeCl3) revêtu d'albumine bovine sérique succinylée, les agrégats de particules d'érythrocytes ainsi obtenus étant entrainés vers l'aimant permettant ainsi de récupérer le plasma clarifié par décantation.

Le brevet WO 02/46758, propose un procédé de magnétisation de globules rouges par l'intermédiaire de particules magnétiques préalablement activées par de l'albumine bovine sérique de sorte de créer de multiples liaisons non spécifiques et de faibles intensités entre la surface de l'hématie et les particules.

Ces techniques utilisant des billes magnétiques ou des ferrofluides modifiés pour magnétiser les globules rouges permettent de s'affranchir des étapes de centrifugation. Elles ont néanmoins l'inconvénient de mettre en œuvre des interactions non spécifiques entre les particules magnétiques et les globules rouges, mais aussi avec tous les éléments présents alors dans la solution biologique. Ces interactions non spécifiques entre les particules magnétiques et les globules rouges sont donc influençables par tout autre élément présent et

notamment par les éléments du plasma du patient à tester au moment du contact entre les particules magnétiques et les érythrocytes.

L'invention proposée présente l'avantage de pouvoir fixer des billes magnétiques de façon spécifique, sur des globules rouges, par reconnaissance d'un antigène exclusivement présent à la surface de ces érythrocytes. Ceci permet de pouvoir magnétiser les globules rouges dans n'importe quelles conditions, sans être gêné par des éléments protéiques, et/ou saccharidiques présents dans le milieu pendant la réaction de magnétisation.

On connaît déjà des procédés de magnétisation de marqueurs à l'aide de particules magnétiques dans lesquels les particules sont liées aux marqueurs par des liaisons covalentes ou spécifiques.

Actuellement de très nombreux systèmes de diagnostic pour la recherche soit d'anticorps présents dans un milieu biologique soit de structures antigéniques provoquant une réponse de l'hôte, sont basés sur l'utilisation de particules magnétiques fonctionnalisées.

Par exemple dans les systèmes ELISA, où les billes magnétiques fonctionnalisées sont couplées à des antigènes ou des anticorps et servent de support réactionnel pour la détection d'analyte dans le plasma. Les supports magnétiques permettent de réaliser des lavages à chaque étape sans utiliser de centrifugation.

Ou bien encore, les billes couplées à des anticorps sont utilisées pour le tri d'une population cellulaire présentant l'antigène CD4 dans un échantillon de sang humain, il est possible de fixer spécifiquement une particule ferromagnétique à la surface des cellules CD4 positives par l'intermédiaire d'un anticorps approprié. Il suffit alors de soumettre l'ensemble de l'échantillon de sang à un champ magnétique, afin d'isoler de la population les cellules ayant interagit avec les particules.

Dans le cadre de l'invention présentée, les érythrocytes magnétisés (ou hématies magnétisées, termes indifféremment utilisés), sont utilisés comme support dans des tests de recherche d'anticorps irréguliers (RAI) ou bien dans l'épreuve de compatibilité ou encore dans le test direct à l'antiglobuline (ou TDA). Il est à noter que ce procédé de magnétisation ne masque pas les antigènes présents à la surface du globule rouge et ne gêne en rien la détection des anticorps irréguliers dirigés contre les antigènes érythrocytaires.

La présente invention consiste ainsi à magnétiser les hématies de façon spécifique, mais aussi d'utiliser ces billes spécifiques directement dans le milieu réactionnel.

Par exemple dans le test de détection des anticorps irréguliers, plusieurs approches peuvent être employées pour réaliser le test en utilisant les billes couplées à l'anti-glycophorine A (anti-GPA).

Ainsi, sous un premier aspect, la présente invention a pour objet un procédé de magnétisation d'érythrocytes caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) le couplage d'anticorps anti-GPA à la surface de particules magnétiques ; et

b) la mise en contact des particules magnétiques revêtues d'anti-GPA obtenues à l'étape a) avec des érythrocytes.

De préférence, le couplage est réalisé par adsorption passive, par couplage covalent, par liaison de type ionique hydrogène, ou encore par couplage de type ligand/récépteur (comme avidine-streptavidine), ceci suivant la nature et la fonctionnalisation des particules magnétiques utilisées.

Les techniques immunodiagnostiques, de capture ou de tri cellulaire mettant en œuvre des particules magnétiques ont fait l'objet de nombreuses publications et sont bien connues de l'homme de l'art.

Parmi ces techniques, on peut citer celles faisant appel à une fonctionnalisation de la particule magnétique permettant d'obtenir une fonction réactive en surface capable de réagir dans des conditions et avec des réactifs appropriés avec l'antigène que l'on souhaite greffer de manière covalente sur la particule, notamment une fonction acide, amine, époxy ou aldhéhyde pour ne citer que les plus courants.

On peut également citer celles faisant appel à une adsorption passive de l'antigène que l'on souhaite fixer sur la particule, notamment par un traitement adéquate permettant d'obtenir des billes chargées positivement ou négativement en fonction des antigènes et des conditions dans lesquelles on souhaite réaliser cette absorption passive.

De préférence encore, l'anticorps anti-GPA est un anticorps de mammifère, de préférence d'origine murine ou humaine, et capable de reconnaître spécifiquement la glycophorine A humaine portée par les érythrocytes, de préférence dirigé contre la sialoglycoprotéine glycophorine A, de préférence encore contre son domaine extramembranaire.

On préfère encore un anticorps monoclonal anti-GPA dirigé contre un épitope de la partie extracellulaire de la sialoglycoprotéine glycophorine A, ledit épitope ne portant pas tout ou partie de l'antigène M ou N, notamment ledit épitope ne comprenant pas le fragment d'acides aminés de 1-5 de la partie N-terminal de la glycophorine A.

De préférence, ledit procédé de magnétisation d'érythrocytes selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape dans laquelle la suspension d'érythrocytes « magnétisés » ainsi obtenue à l'étape b) est dilué dans un diluant comprenant un détergent non-ionique telle que défini dans les procédés ci-après, de préférence ledit diluant est un diluant basse force ionique comprenant un polymère hydrophile tel que ci-après également défini.

Sous un autre aspect, la présente invention a pour objet un procédé de mise en évidence d'un complexe spécifique formé par réaction entre un anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin, présent dans une solution et un antigène de groupe ou phénotype sanguin porté par un érythrocyte, ledit érythrocyte étant lié à une particule magnétique, la réaction s'effectuant dans un réacteur ouvert vers le haut et à fond fermé et dont la section diminue au moins dans la zone voisine du fond pour former une paroi inclinée s'étendant jusque dans le fond, ladite paroi inclinée étant au moins en partie revêtu d'une anti-immunoglobuline ou de tout autre composé capable de se lier à l'anticorps dudit complexe formé, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) préalablement à la mise en contact de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes avec la solution susceptible de contenir les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin :

- le remplissage du réacteur avec une substance visqueuse de manière à recouvrir au moins en partie la paroi inclinée du réacteur,

b) la mise en contact au-dessus de la solution visqueuse contenue dans le réacteur de la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps avec la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes ;

c) l'incubation du réacteur pendant un temps donné nécessaire à la formation du complexe entre les particules magnétiques portant les érythrocytes et les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin susceptible d'être contenus dans la solution et

de reconnaître spécifiquement lesdits antigènes de groupe ou phénotype sanguin porté par les érythrocytes ;

d) l'application d'un champ magnétique audit réacteur et l'agitation du réacteur, de telle manière que les particules magnétiques soient entraînées vers le fond et/ou la paroi inclinée du réacteur ; et

e) la lecture à l'œil et/ou par tout autre système de lecture appropriée, de l'image obtenue au fond du réacteur et/ou sur la paroi inclinée du réacteur revêtue de ladite anti-immunoglobuline ou de tout autre composé capable de se lier à l'anticorps, cette image obtenue permettant de mettre en évidence la présence ou non de la formation d'un complexe spécifique anticorps/antigène de groupe ou phénotype sanguin,

caractérisé en ce que lesdites particules magnétiques portant les érythrocytes sont des particules magnétiques qui ont été préalablement revêtues d'un anticorps anti-glycophorine A (anti-GPA) et en ce que ledit érythrocyte est lié à ladite particule magnétique par une liaison de type anticorps/antigène.

De manière générale, l'anticorps du complexe spécifique anticorps/antigène peut être de nature IgG, IgM, IgA ou IgE ou de tout autre classe d'anticorps.

Par anti-immunoglobuline capable de se lier à l'anticorps dudit complexe formé, on entend désigner ici par anti-immunoglobuline, les anti-immunoglobulines, polyclonales ou monoclonales, capables de reconnaître et de fixer tout anticorps, notamment humain, qu'il soit de type IgG, IgM, IgA ou IgE (anti-immunoglobuline totale), ou certaines classes particulières d'anticorps, notamment anti-IgG spécifique. De telles anti-immunoglobulines, notamment humaines, sont bien connues de l'homme de l'art et disponibles chez de nombreux fournisseurs, et ne seront pas développées ici, notamment leurs procédés de production.

De préférence encore, lorsque cet anticorps à rechercher est de type IgG, on préférera comme anti-immunoglobuline, une anti-IgG, notamment humaine (dirigée contre des anticorps d'origine humaine).

De préférence encore, lorsque cet anticorps à rechercher est de type IgG ou IgM, on préférera comme anti-immunoglobuline, un mélange d'anti-IgG/anti-IgM notamment humaines.

Par tout autre composé capable de se lier à l'anticorps dudit complexe formé, on entend particulièrement les composés de type protéine A ou protéine G bien connue de l'homme de l'art pour reconnaître et fixer spécifiquement les anticorps.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit procédé de mise en évidence d'un complexe anticorps/antigène de groupe ou phénotype sanguin selon la présente invention est caractérisé en ce que le procédé mis en œuvre pour magnétiser les érythtocytes est le procédé de magnétisation d'érythrocytes selon l'invention décrit ci-avant.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que préalablement à la mise en contact de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes avec la solution susceptible de contenir les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin, ladite suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes est en suspension dans un diluant dont la densité est supérieure à 1 et inférieure à la densité de ladite solution visqueuse.

Dans un mode de réalisation également préféré, le dit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que lesdites étapes a) et b) sont les suivantes :

a) préalablement à la mise en contact de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes avec la solution susceptible de contenir les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin :

i) la préparation de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes à l'extérieur dudit réacteur,

ii) le remplissage du réacteur avec une substance visqueuse de manière à recouvrir au moins en partie la paroi inclinée du réacteur, puis avec ledit diluant ;

b) la mise en contact au-dessus du diluant de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes préparée à l'étape a)i) avec la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que lesdites étapes a) et b) sont les suivantes :

a) préalablement à la mise en contact de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes avec la solution susceptible de contenir les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin :

- le remplissage du réacteur avec une substance visqueuse de manière à recouvrir au moins en partie la paroi inclinée du réacteur, puis avec ledit diluant puis avec la suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA puis de la suspension d'érythrocytes ;

b) la mise en contact dans le réacteur de la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps avec la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes formée ou en cours de formation.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que lesdites étapes a) et b) sont les suivantes :

a) préalablement à la mise en contact de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes avec la solution susceptible de contenir les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin :

i) la préparation à l'extérieur dudit réacteur d'une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA, lesdites particules magnétiques étant en suspension dans ledit diluant, ou la mise à disposition d'une telle suspension déjà préparée,

ii) le remplissage du réacteur avec une substance visqueuse de manière à recouvrir au moins en partie la paroi inclinée du réacteur, puis avec une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA dans ledit diluant préparée à l'étape a)i), puis de la suspension d'érythrocytes ;

b) la mise en contact dans le réacteur de la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps avec la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes formée ou en cours de formation.

Dans ce dernier mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que :

- à la fin de l'étape a)i), on met ensuite en contact ladite suspension comprenant lesdites particules magnétiques en suspension dans ledit diluant avec la suspension d'érythrocytes à l'extérieur du réacteur pour former une suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes en suspension dans ledit diluant ; et

-à l'étape a)ii) le remplissage du réacteur avec une substance visqueuse de manière à recouvrir au moins en partie la paroi inclinée du réacteur, puis avec ladite suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes en suspension dans ledit diluant ;

b) la mise en contact dans le réacteur de la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps avec la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes.

Dans un autre mode de réalisation particulièrement préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que dans le cadre notamment d'une automatisation de la distribution des réactifs par un automate de laboratoire, lesdites étapes a) et b) sont les suivantes :

a) préalablement à la mise en contact de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes avec la solution susceptible de contenir les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin :

i) la préparation à l'extérieur dudit réacteur d'une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA, lesdites particules magnétiques étant en suspension dans ledit diluant, ou la mise à disposition d'une telle suspension déjà préparée,

ii) le remplissage du réacteur avec la suspension d'érythrocytes, puis avec une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA dans ledit diluant préparée à l'étape a)i), puis, le cas échéant après agitation, avec ladite substance visqueuse de manière à recouvrir au moins en partie la paroi inclinée du réacteur, ladite substance visqueuse étant injectée au fond du réacteur ;

b) la mise en contact dans le réacteur de la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps avec la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes formée ou en cours de formation.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'application d'un champ magnétique audit réacteur et l'agitation du réacteur sont réalisées simultanément (voir figures 1A et 1B comme exemple de dispositif permettant de réaliser ces différentes étapes).

Par simultanément, on entend désigner un laps de temps ne devant pas excéder plus de 20 s où seule une agitation ou une application du champ magnétique est réalisée.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'application du champ magnétique et l'agitation sont réalisées simultanément pendant une durée comprise entre 2,5 min. et 10 min., de préférence pendant une durée comprise entre 5 min. et 6 min..

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'application du champ magnétique est

réalisée au moyen d'un aimant situé à l'extérieur sous le réacteur de telle manière que les particules magnétiques soient entraînées au fond du réacteur.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'agitation est réalisée au moyen d'un agitateur rotatif.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'agitation est effectuée à une vitesse comprise entre 250 et 750 trs/min, de préférence à 600 trs/min.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce qu'à l'étape c), la durée d'incubation est comprise entre 10 min. et 30 min. à une température comprise entre 20°C et 40°C, de préférence à une température de 37°C ± 1°C.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, la présente invention comprend un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'agitation du réacteur est effectuée en présence du champ magnétique.

A l'étape d), l'étape d'application du champ magnétique et l'étape d'agitation du réacteur peuvent être réalisées en commençant par l'une ou par l'autre, mais de telle sorte qu'au moins pendant un temps donné, l'application du champ magnétique et l'agitation soient simultanées.

Bien entendu, est également comprise dans le procédé selon l'invention, une variante du procédé selon l'invention dans lequel une application du champ magnétique est effectuée avant l'agitation du réacteur à l'étape d) du procédé, cette application du champ magnétique seule (sans agitation) ne devant pas excéder une durée d'au plus 2 min., de préférence d'au plus 1 min. 30 s., 1 min. ou 30 s.. Il en est de même si l'agitation était effectuée avant l'application du champ magnétique, cette période d'agitation seule ne devant pas excéder une durée d'au plus 2 min., de préférence d'au plus 1 min. 30 s., 1 min. ou 30 s..

La présente invention comprend un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'application du champ magnétique est réalisée au moyen d'un aimant situé à l'extérieur sous le réacteur de telle manière que les particules magnétiques soient entraînées vers le fond du réacteur, de préférence selon l'axe longitudinal du réacteur.

Dans un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, à l'étape d), ledit aimant est un aimant permanent de magnitude comprise entre 8 000 et 16 000 gauss, de préférence entre 10 000 et 14 000 gauss, de manière plus préférée entre 11 500 et 12 500 gauss, une magnitude de 12 000 gauss étant encore plus préférée.

Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention comprend un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'agitation est réalisée au moyen d'un agitateur rotatif.

Par agitateur rotatif, on entend citer ici particulièrement une plateforme rotative dont le réacteur, ou l'ensemble des réacteurs lorsqu'il s'agit notamment d'une microplaque de 96 cupules, est solidaire (voir figures 1A et 1B).

Dans un mode particulier d'agitation, la présente invention comprend un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'agitation est une agitation rotative ayant une orbitale comprise en proportion entre 1,0 mm et 2,5 mm de diamètre, de préférence entre 1,25 mm et 2,25 mm, entre 1,5 mm et 2 mm de diamètre, 2 mm étant le diamètre de l'orbitale préférée, lorsque le réacteur a comme diamètre 7 mm pour sa plus grande section.

Par proportion, on comprendra ici que par exemple lorsque le diamètre de la plus grande section du réacteur est le double ou la moitié de 7 mm, le diamètre correspondant de l'orbitale de rotation mentionné sera respectivement doublé ou divisé par 2.

Par orbitale pour une agitation de type rotative, on entend désigner le diamètre du cercle décrit par le point le plus bas du réacteur lors de l'agitation (point le plus bas de l'axe central longitudinal du réacteur).

Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention comprend un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'agitation est effectuée à une vitesse comprise entre 250 et 750 trs/min, de préférence entre 400 et 600 trs/min.

Dans un mode de réalisation particulier, l'aimant situé sous chacun des réacteurs est solidaire de la plateforme d'agitation (voir également figures 1A et 1B).

Dans ce dernier cas, l'axe central longitudinal de l'aimant situé sous le réacteur suit l'orbitale suivie par l'axe central longitudinal du réacteur pendant l'agitation.

Dans un mode de réalisation particulier, l'aimant situé sous chacun des réacteurs est désolidarisé de la plateforme d'agitation. Dans ce dernier cas, l'axe central

longitudinal de l'aimant situé sous le réacteur ne bouge pas et ne suit pas l'orbitale suivie par l'axe central longitudinal du réacteur pendant l'agitation.

La présente invention comprend un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape c), la durée d'incubation est comprise entre 10 min. et 30 min., de préférence entre 15 min. et 25 min..

Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention comprend un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape c), l'incubation est réalisée à une température comprise entre 10°C et 40°C, de préférence entre 25°C et 40°C, entre 30°C et 40°C, de préférence à environ 37°C (37°C ± 1°C).

Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention comprend un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape b), l'incubation est réalisée à une température comprise entre 30°C et 40°C, de préférence à 37°C.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que les particules magnétiques ont un diamètre compris entre 100 nm et 3,0 µm, de préférence entre 200 nm et 1,5 µm, de préférence fonctionnalisées par une fonction tosyl, carboxylique, amine ou encore alcool.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que lesdites particules magnétiques contiennent au moins 40 % en poids au moins de composés ferromagnétiques, de préférence compris entre 40 % et 50 %.

Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention comprend un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape a), le remplissage préalable du réacteur avec une substance visqueuse ou un gel homogène est réalisé avec une substance visqueuse ou un gel dont la densité est telle qu'elle empêche la migration des anticorps n'ayant pas formé de complexe avec les antigènes liés aux particules magnétiques vers la paroi inclinée et le fond du réacteur revêtu d'anti-immunoglobuline ou du composé capable de reconnaître l'anticorps lors de l'étape d).

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que ladite substance visqueuse est une substance visqueuse de densité supérieure à 1.

De manière plus préférée, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que ladite substance visqueuse est choisi parmi les gels, de préférence choisie parmi les gels dérivés de dextran Sephadex™ ou de Sepharose™ dont le diamètre des billes peut varier de 20 nm à 300 nm, de préférence du G-100™ superfine ou du Sepharose™ 4B ou 6B, parmi le PVP (polyvinylpyrrolidone), PVP-40 ou PVP-60, ou encore parmi des solutions d'albumine à 30 % ± 10 % ou encore de gélatine.

Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention comprend un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'à la première étape, le gel est un gel de dextran ou d'agarose (Type Sepharose™ (Pharmacia, Suède), notamment le Sepharose™ 4B ou 6B). Dans un mode réalisation également préféré, lorsque ladite solution est de type gel, ce gel est préparé en présence de sérum albumine bovine afin d'augmenter la densité de la solution de gel, de préférence à des concentrations finales dans la solution de gel comprises entre 5 % et 15 % en p/v, de préférence à 10 % ± 2,5 %.

Dans un mode réalisation préféré, la présente invention comprend un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape 1, la solution visqueuse ou gel est du Sephadex™ (Société Pharmacia, Suède ou Sigma Aldrich), de préférence du G-10™, du G-50™, du G-75™, du G-100™, du G-150™ ou du G-200™, dont le diamètre des billes de dextran peut varier entre 20 nm et 300nm. De manière plus préférée le Sephadex™ est le G-100™ superfine.

De préférence encore, la concentration en gel, notamment en Sephadex™ ou Sepharose™ est comprise entre 1,5 % et 6 % de préférence entre 2 % et 5 %, entre 2,5 % et 4 %. La concentration de 3 % ± 0,5 % en p/v étant la plus préférée, notamment pour le Sephadex™, en particulier pour le G-100™ superfine.

Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention comprend un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape 2, la solution contenant ou susceptible de contenir les billes couplées à l'anti-glycophorine A est déposée sur la solution visqueuse avant le dépôt de la suspension de globules rouges portant ledit antigène.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce qu'à l'étape b), la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps peut être déposée avant la suspension d'érythrocytes lorsque cette dernière est déposée après la solution visqueuse et après ledit diluant.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit diluant a comme densité, une densité inférieure à la densité de ladite solution visqueuse et supérieure à la densité de la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit diluant est une solution comprenant un polymère hydrophile à une concentration permettant d'ajuster sa densité à une densité comprise entre celle du plasma ou sérum et celle de ladite solution visqueuse.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit diluant est une solution comprenant un polymère hydrophile polysaccharidique, de préférence du Ficoll™, notamment du Ficoll™ 400, à une concentration comprise entre 1 % et 2,5 % (m/v), de préférence à 2 % ± 0,3 %.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que le réacteur est une cupule de microplaque à fond rond ou à fond V.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que la solution d'anticorps est un échantillon de plasma ou de sérum humain dans lequel on cherche à mettre en évidence la présence d'un anticorps dirigé spécifiquement contre un antigène de groupe ou de phénotype sanguin, et en ce que l'anti-immunoglobuline est une anti-immunoglobuline humaine (AHG).

Sous un aspect particulièrement préféré, ledit procédé selon la présente invention est un procédé pour la recherche et d'agglutinines irrégulières (RAI) dans un échantillon de sérum ou plasma, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle les érythrocytes portés par les billes magnétiques sont des érythrocytes de groupe O.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que la concentration d'érythrocytes dans la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes est comprise entre 0,2 % et 2,5 %, de préférence comprise entre 0,5 % et 1,5 %, de préférence 1 % ± 0,3 %.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que la concentration de particules magnétiques dans ladite suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes est comprise entre 0,2 % et 2,5 %, de préférence comprise entre 0,5 % et 1,5 %, de préférence 1 % ± 0,3 %.

Sous un autre aspect particulièrement préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que l'anticorps anti-GPA est un anticorps de mammifère, de préférence d'origine murine ou humaine, et capable de reconnaître spécifiquement la glycophorine A humaine portée par les érythrocytes, de préférence dirigé contre la sialoglycoprotéine glycophorine A, de préférence contre son domaine extramembranaire, de préférence encore un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope de la partie extracellulaire de la sialoglycoprotéine glycophorine A, ledit épitope ne portant pas tout ou partie de l'antigène M ou N, notamment ledit épitope ne comprenant pas le fragment aa1-5 N-terminal de la glycophorine A.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que l'anticorps anti-GPA est couplé aux particules magnétiques à une concentration comprise entre 5 µg/mg et 25 µg/mg de particules magnétiques, de préférence à 20 µg/mg de particules magnétiques.

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que ladite suspension de particules magnétiques est à une concentration comprise entre 0,004 % et 0,02 % (m/v).

Le couplage de l'anticorps anti-GPA est réalisé sur des billes magnétiques contenant des groupements fonctionnels.

Ces groupements fonctionnels peuvent être de différentes natures tels que des fonctions amines (-NH2) ou des fonctions alcooliques (-OH), des fonctions carboxyliques (-COOH) ou bien encore des fonctions Tosyl, toutes ces fonctions sont bien connues de l'homme de l'art.

Les liaisons ainsi établies entre l'anticorps et la bille magnétique peuvent être de natures électrostatiques, hydrophobes ou covalentes. La fixation covalente de l'anticorps, sur les billes magnétiques est réalisée par l'intermédiaire de groupements fonctionnels à la surface des billes. Parmi les fournisseurs, dont les particules magnétiques peuvent être utilisées dans le cadre de cette invention, on peut citer en

particulier la société Ademtech (33600 Pessac, France) qui proposent des billes magnétiques d'environ 100 à 500 nm de diamètre pouvant être fonctionnalisées par une fonction acide ou amine ainsi que les protocoles et réactifs permettent d'effectuer le greffage souhaité avec ces fonctions. Ces particules magnétiques sont constituées à plus de 50 % d'un noyau de composé ferromagnétique (type oxyde de fer), ce noyau étant enrobé de polystyrène. On peut également citer la société Bioclone Inc. (San Diego, CA, USA) qui propose tout un catalogue de billes magnétiques fonctionnalisées pouvant être utilisées. On peut citer encore la société Dynal (Invitrogen, USA) avec sa gamme très variée de Dynabeads™ proposant notamment des microbilles magnétiques activées à la streptavidine, au Tosyl ou activées par une fonction carboxylique. On peut également citer la société Merck - Chimie SAS (Fontenay Sous Bois, France) qui avec sa gamme de microparticules magnétiques ESTAPOR™ propose différentes tailles de particules (de 200 nm à 1,5µm) à base de polystyrène ou de divinylbenzène pouvant comprendre jusqu'à plus de 50 % de ferrite et pouvant être fonctionnalisées ou non, par exemple avec une fonction carboxylique, amine ou Tosyl. Ces particules sont préparées par un procédé mettant en œuvre une polymérisation de styrène en présence du composé ferromagnétique. On peut encore citer la société JSR Micro (Japon), qui propose des particules magnétiques de différentes tailles de 1 µm à 3 µm activées à la streptavidine ou comportant des fonctions carboxyliques ou Tosyl. Les billes magnétiques de chez JSR sont composées d'une particule centrale recouverte de substance magnétique, laquelle sera recouverte par un monomère permettant d'encapsuler la substance magnétique. Parmi les billes proposées on préférera des billes hydrophobes de taille 1 µm avec un contenu en fer d'environ 48 % et un taux de fonctions carboxyliques d'environ 15 nmol par mg de billes. Ces billes ont la caractéristique de pouvoir permettre un couplage par adsorption physique ou par couplage chimique.

Les billes magnétiques pouvant être utilisées dans cette invention sont super-paramagnétiques, la taille des particules magnétiques pouvant atteindre 200 nm à 1,5 µm, plutôt de type hydrophobes et fonctionnalisées par des groupements carboxyliques ou Tosyl.

Le taux moyen de fer des billes magnétiques est d'environ 45 % pour des billes carboxyliques et d'environ 30 % pour des billes Tosyl.

Le taux de fonctionnalisation en groupements fonctionnels est variable, pour des billes de type Tosyl le nombre de fonction varie de 40 à 80 µeq/gramme de billes, alors que pour des billes avec des groupements carboxyliques, le nombre de fonctions peut varier de 20 µeq/gramme de billes à 350 µeq/g.

Dans cette invention nous préférerons utiliser les billes magnétiques de chez ESTAPOR™ de taille 200 à 300 nm, contenant au moins 40 % de composé ferromagnétique, et une quantité de fonctions carboxyliques d'environ 130 µeq/gramme de billes, obtenues sous la référence M1-030/40. Ou bien encore du même fournisseur, on pourra utiliser les billes magnétiques comportant des fonctions Tosyl avec un nombre de fonctions pouvant varier de 40 à 80 µeq/gramme de billes pour une taille de bille d'environ 1,2 µm de diamètre et obtenues sous la référence R01-24. Une autre alternative, qui sera préférée, pour cette invention est l'utilisation des billes magnétiques de la société JSR Micro de diamètre 1µm, de type hydrophobe fonctionnalisées avec des groupements carboxyliques à un taux de 17 nmol/gramme de billes et obtenues sous la référence MB100.

Pour les billes fonctionnalisées avec des fonctions acides, nous préférerons utiliser un couplage par adsorption physique plutôt que par couplage chimique.

Les billes sont couplées à un anticorps monoclonal murin purifié, d'isotype IgG2a, spécifique de la sialoglycoprotéine glycophorine A.

La concentration de l'anticorps anti-glycophorine A, couplée aux billes magnétiques fonctionnalisées peut varier de 5 µg/mg de billes à 25 µg/mg de billes, avec une préférence pour une concentration de 20 µg/mg de billes.

A la fin du couplage, les billes couplées à l'anti-glycophorine A est constituée d'un tampon PBS contenant de la BSA à 0,1 % (m/v) ainsi qu'un détergent non ionique, de type synpéronic PE/F68. Le synpéronic PE/F68 est un surfactant non ionique hydrophile appelé aussi poloxamère synpéronic F68 et obtenu chez Sigma Aldrich sous la référence : 81 112. Ce polymère tri blocs est composé d'une partie centrale hydrophobe constituée de blocs de polyoxypropylène, entourée de 2 blocs hydrophiles de polyoxyéthylène.

L'utilisation de détergent est particulièrement préférée lorsqu'on utilise des nano- ou microparticules, afin d'éviter l'agrégation spontanée de celles-ci qui peut avoir lieu dans des conditions physico-chimiques particulières de pH, de force ionique et de

température. Il a été démontré notamment que la modification de surface des particules par adsorption de macromolécules amphiphiles non ioniques telles que les poloxamères aident à la non agrégation des particules en solution.

Notamment lorsque des particules sont mises en solution dans un tampon de force ionique élevée, tel que le PBS (tampon phosphate salin), les nano-/microparticules ont tendance à perdre leur stabilité colloïdale et à s'agréger. L'ajout d'un surfactant permet alors de garder cette stabilité colloïdale et d'éviter une agrégation des particules dans un tampon de force ionique élevée.

Il existe plusieurs type de surfactant non ionique tels que le Tween 20, 60, et 80 ou bien encore le Synpéronic PE/F68 ou F127. Dans cette invention nous préférons l'utilisation du synpéronic PE/F68.

Pour avoir une action efficace sur la stabilité colloïdale des billes couplées aux différents anticorps, la concentration du synpéronic doit être supérieure à 0,1 % et inférieure à 2,5 %, seuil de viabilité des cellules en présence de cette concentration de surfactant. Avec une préférence pour une concentration de 0,5 % (m/v).

Dans un autre mode de réalisation particulièrement préféré, ledit procédé selon la présente invention est caractérisé en ce que ladite suspension de particules magnétiques est une suspension comprenant un détergent, de préférence non ionique, de préférence choisi parmi les poloxamères, comme le synpéronic™ PE/F68,ou choisi parmi le Tween™ (20, 40, 60 ou 80), lesdits détergents étant à une concentration comprise entre 0,1 % et 1 % (m/v), de préférence 0,25 % et 0, 75 % (m/v), ou 0,5 % ± 0,15 %.

Une fois couplées les billes, sont alors stockées à une concentration de 1 % (m/v) dans une solution comportant du PBS (0,3M) + 0,1 % (m/v) de BSA + 0,5 % (m/v) de synpéronic PE/F68, et ce jusqu'à leur dilution dans le diluant final.

Puis les billes sont diluées à une concentration de 0,004 % dans le diluant final qui sera déposé sur la solution visqueuse (ou encore appelé barrière filtrante ou encore appelé gel) au-dessus de l'AGH.

Ce diluant final dans lequel sont diluées les billes couplées à l'anti-glycophorine A, est de densité supérieure à 1 et composé de préférence d'un tampon de basse force ionique (ou tampon « LISS » ou « BFI ») et d'un polymère hydrophile, de préférence un polysaccharide hydrophile, notamment le Ficoll 400. La concentration de ce

polysaccharide, dans le tampon de basse force ionique est de préférence 2%. Le tampon de basse force ionique est bien connu de l'homme de l'art en immuno-hématologie, en ce qu'il favorise et accélère les réactions entre les anticorps et les hématies. Ce tampon pouvant être le cas échéant réalisé en présence d'une concentration finale en sérum albumine (BSA) comprise entre 1,5 % et 6 % (p/v), ce qui permet de donner une certaine viscosité au milieu et de contrôler la vitesse de progression des hématies vers la partie révélatrice de la microplaque. L'inconvénient d'un tel tampon contenant de l'albumine est sa propension à former de la mousse. C'est pourquoi nous préférons lui substituer un composé ne présentant pas d'effet moussant. Le choix s'est porté du Ficoll 400 qui est un polymère de sucres qui s'hydrate assez facilement et qui est particulièrement stable en solution. Il s'agit d'un produit de synthèse dont la reproductibilité est avérée, du fait de son utilisation dans de nombreux protocoles biologiques de séparation cellulaire. Sa densité est donc reproductible, il est incolore et ne mousse pas de façon durable du fait de sa structure qui interagit avec l'eau librement. La concentration utilisée permet d'obtenir une densité de la solution comparable à celle obtenue avec de l'albumine à 3 %. Il oppose aux hématies en progression un coussin de densité nécessaire et suffisant. La densité du diluant contenant 2 % de Ficoll 400 est ainsi égale à 1,013g/cm3.

Exemple de composition préférée pour le diluant contenant les particules magnétiques :

Pour 1 litre :

- Na_2HPO_4, $2H_2O$: 0,213 g
- NaH_2PO_4, $2H_2O$: 0,240 g
- NaCl : 1,788 g
- Glycine : 18,05 g
- Azide de Na : 0,9 g
- Ficoll 400 : 20g

Osmolarité : 310 +/- 20 mOsm

pH : 6,75 +/- 0,1

Dans certaines applications, notamment lorsqu'il s'agira d'améliorer la sensibilité ou la vitesse de réaction (sans toutefois augmenter la non spécificité du test),

on pourra utiliser un tampon dit de basse force ionique (BFI), appelé encore tampon LISS (« LISS » pour « Low Ionic Strength Solution »).

Par tampon ou solution physiologique, l'homme de l'art comprendra qu'il s'agit ci-avant de tampon habituellement utilisé dans le domaine de la biologie cellulaire, notamment en immunohématologie afin d'éviter la lyse des globules rouges, notamment pour l'application RAI ou phénotypage. De tels tampons ou solutions seront par exemple des tampons à pH physiologique, compris entre 6,8 et 7,5, avec une molarité des constituants du tampon ajustée de telle sorte que la solution finale obtenue s'apparente pour la pression osmotique à la molarité d'une solution de type NaCl à 9 pour mille (proche de 0,15 M de NaCl). On peut notamment citer mais sans s'y limiter le tampon phosphate type PBS à pH 7,0 – 7,4 bien connu de l'homme de l'art.

La composition des tampons BFI ou LISS ne sera pas ici développée, ces tampons étant bien connus en immunohématologie pour favoriser les réactions d'agglutination. Ces tampons sont notamment disponibles auprès des fournisseurs de réactifs pour l'immunohématologie (on pourra citer pour exemple, mais sans s'y limiter le tampon LISS de composition suivante : 16 g/l de glycine, 0,03 M de NaCl et 0,015 M phosphate à pH 6,7).

Dans un autre mode de réalisation préféré, ledit procédé selon la présente invention est mis en œuvre pour la réalisation d'un test de compatibilité entre donneur et receveur, ou dans le cadre de la réalisation d'un test de Coombs direct.

Sous un autre aspect, la présente invention a pour objet un kit pour la mise en évidence d'un complexe spécifique formé par réaction entre un anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin, présent dans une solution et un antigène de groupe ou phénotype sanguin porté par un érythrocyte, notamment pour la RAI ou pour réaliser un test de compatibilité, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) un réactif comprenant une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA, de préférence telle que défini dans l'un des procédés selon l'invention ; et

b) - un réacteur ou un ensemble de réacteurs ouvert vers le haut et à fond fermé et dont la section diminue au moins dans la zone voisine du fond pour former une paroi inclinée s'étendant jusque dans le fond, ladite paroi inclinée étant au moins en partie revêtue

d'une anti-immunoglobuline ou de tout autre composé capable de se lier à l'anticorps dudit complexe formé,

- un container contenant une solution visqueuse, ou le cas échéant, chacun des réacteurs étant rempli en partie de ladite substance visqueuse, ladite substance visqueuse étant telle que définie dans l'un des procédés selon l'invention ; et,

c) le cas échéant, un container contenant un diluant, ledit diluant étant une solution comprenant un polymère hydrophile, de préférence de nature polysaccharidique, de préférence du Ficoll™, notamment du Ficoll™ 400, à une concentration comprise entre 1 % et 2,5 % (m/v), de préférence à 2 % ± 0,3 %,

d) le cas échéant, au moins un aimant ou un ensemble d'aimants pouvant être disposé à l'extérieur sous le ou les réacteurs couplé(s) à un agitateur rotatif.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit kit selon la présente invention est caractérisé en ce qu'il contient une suspension d'érythrocytes tests de phénotype connu sur lesquels érythrocytes seront couplées lesdites particules magnétiques de la suspension, de préférence la suspension d'érythrocytes est de groupe O, et à concentration comprise entre 0,2 % et 2,5 %, de préférence comprise entre 0,5 % et 1,5 %, de préférence 1 % ± 0,3 %.

Dans la présente description les termes érythrocyte, globule rouge et hématie seront employés indifféremment pour désigner la même cellule sanguine.

De préférence également, l'invention concerne un kit selon l'invention, caractérisé en ce que la substance visqueuse et le cas échéant les particules magnétiques ou la suspension des érythrocytes magnétisées, le cas échéant les caractéristiques de l'aimant et de l'agitateur rotatif, a ou ont les caractéristiques telles que définies pour le procédé selon l'invention avec également les préférences définies pour ces solutions visqueuses ou autres composés et éléments.

De préférence encore, l'invention concerne un kit selon l'invention, caractérisé en ce que ledit réacteur est une cupule de microplaque, de préférence à fond rond (hémisphérique) ou à fond en V, une microplaque comprenant 96 cupules étant encore plus préférée.

Les figures dont les légendes sont ci-après, ainsi que les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans pour autant en limiter la portée.

Légendes des figures

Figures 1A et 1B : Schéma vue de dessus (figure 1A) et vue de côté (figure 1B) de la plate-forme d'agitation (« teleshake™ ») comprenant une plaque de fer doux sous la microplaque sur laquelle plaque de fer doux est fixé magnétiquement chacun des aimants en forme de pile sous chaque cupule de la microplaque.

(1) Gabarit en plastique permettant d'obtenir le bon espacement des aimants ; (2) Eléments permettant de caler la plaque d'aimants sur le teleshake ; (3) Taquet du Teleshake permettant de caler les microplaques ; (4) Aimant piles ; (5) Microplaque ; (6) Gabarit plastique ; (7) Plaque de fer doux sur laquelle les aimants sont fixés magnétiquement ; (8) Plaque de carton isolant le teleshake du champ magnétique des aimants piles ; (9) Plateau rotatif du teleshake.

Figures 2A et 2B : Schéma d'une cupule réacteur à fond rond (ou en U) après revêtement avec de l'anti-immunoglobuline sur sa paroi inclinée (en partie) et au fond de la cupule avant l'ajout de la solution visqueuse et des différents solutions et réactifs (figure 2A). Schéma d'une cupule réacteur à fond rond (ou en U) après revêtement avec de l'anti-immunoglobuline sur sa paroi inclinée (en partie) et au fond de la cupule avec l'ajout de la substance visqueuse et de la suspension d'érythrocytes « magnétisées » dans le diluant, et l'ajout du plasma ou sérum à tester (exemple de réalisation parmi d'autres) (figure 2B)

Figure 3 : Photographie montrant une image d'une réaction positive d'immuno-adhérence avec des antigènes portés par des érythrocytes (formation de complexe spécifique adhérent à la paroi inclinée revêtue d'anti-immunoglobuline) (figure de gauche) et photographie montrant une image d'une réaction négative (pas de formation de complexe spécifique) (figure de droite).

Figure 4: Test de détection des anticorps irréguliers utilisant la méthodologie n°3.

Figure 5 : Test de détection d'anticorps irréguliers sur une gamme d'anti-D.

Figures 6 et 7 : Cross match réalisés sur des globules de donneurs de groupe O.

Figure 8 : Couplage des billes magnétiques à l'anti-glycophorine A.

Figure 9 : Principe de magnétisation des globules rouges humains par l'anti-GPA.

Figures 10-12 : Trois méthodes de magnétisation des hématies avec les billes couplées à l'anti-GPA dans le test de détection des anticorps irréguliers.

EXEMPLE 1 : MATERIEL ET METHODES

A) Exemple de Couplage de l'anti-glycophorine A aux billes Tosyl

(Voir figure 8)

Le couplage de l'anticorps anti-glycophorine A, aux billes Tosyl de chez ESTAPOR™ (référence : R01-24) peut être réalisé soit dans un tampon borate à 0,1 M pH 9,5, soit dans un tampon phosphate à 0,1M à pH 7,4.

Avant le couplage, les billes magnétiques de type Tosyl sont lavées 2 fois à l'aide d'un aimant dans le tampon de couplage choisi. Le couplage est réalisé en reprenant les billes dans le tampon de couplage (borate ou phosphate) et en y ajoutant l'anticorps à une concentration de 10µg/mg de billes à coupler. Le couplage de l'anticorps est réalisé en présence d'ammonium sulfate à 3M.

- 25 mg de billes magnétiques de type Tosyl (soit 250 µl de billes à 10 %) sont lavées 2 fois sur aimant dans un tampon phosphate 0,1 M à pH7,4 ou borate 0,1M à pH 9,5
- Le surnageant est retiré dans sa totalité
- 10 µg d'anti-glycophorine A sont ajoutés aux billes
- 250 µl de sulfate d'ammonium à 3M sont ajoutés au mélange billes anticorps pour atteindre une concentration finale de 1 à 1,5 M
- La suspension de billes est homogénéisée par vortex
- Le tube contenant les billes + l'anti-glycophorine A est placé sous agitation pendant 24 à 48 heures à température ambiante.

A la fin du couplage, le surnageant de couplage est retiré sous aimant et les billes couplées sont reprises dans un tampon de saturation contenant du PBS (0,3M) et 0,5% (m/v) de BSA. Elles sont incubées dans ce tampon pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation.

A la fin de la saturation les billes sont placées sous aimant, le surnageant est retiré et remplacé par une solution de conservation contenant du PBS (0,3M) + 0,1 % (m/v) de BSA + 0,5 % (m/v) de synpéronic PE/F68.

La concentration des billes avant leur utilisation est de 1% dans le tampon de conservation.

B) Exemple de couplage de l'anti-glycophorine A aux billes carboxyliques

Le mode de couplage préféré de l'anti-GPA aux billes carboxyliques ESTAPOR est un couplage par adsorption physique.

La référence des billes utilisées chez ESTAPOR est M1-030/40.

La concentration en anti-GPA peut varier de 5 µg/mg billes à 25 µg/ mg de billes avec une préférence pour 10µg d'anticorps /mg de billes.

Le couplage de l'anticorps anti-GPA aux billes magnétiques portant des fonctions carboxyliques, se fait de la façon suivante :

- 250 µl de billes à 10 % (soit 25 mg de billes) sont lavées 2 fois sur aimant dans 1 ml de tampon Phosphate 10 mM, pH 6.
- A la fin du lavage, le surnageant est totalement aspiré et les billes sont reprises dans 1,5 ml de tampon phosphate à 20mM pH7,5.
- Puis l'anticorps est immédiatement ajouté à une concentration de 10µg/mg de billes.
- Après mélange par vortex les tubes contenant les billes + l'anticorps sont incubés pendant 2 heures à température ambiante sous agitation.
- A la fin de l'incubation le tube est placé sur aimant et le surnageant est retiré.
- Les billes sont alors lavées 3 fois dans un tampon phosphate 20 mM pH 7,5.
- Les billes sont ensuite saturées dans du PBS (0,3M) + 0,5 % (m/v) BSA pendant 2 heures à température ambiante sous agitation.
- A la fin de la saturation, le surnageant est retiré en plaçant le tube sur aimant et remplacé par 2,5 ml de PBS (0,3M) + 0,1 % (m/v) BSA + 0,5 % (m/v) de synpéronic PE/F68, la concentration des billes dans ce tampon est de 1%.
- Les billes sont conservées à 4°C.

C) Exemple de couplage de l'anti-glycophorine A aux billes carboxyliques de chez JSR

Le mode de couplage préféré de l'anti-GPA aux billes carboxyliques de chez JSR Micro est un couplage par adsorption physique.

La référence des billes utilisées est Magnospheres MB100.

La concentration en anti-GPA peut varier de 5 µg/mg billes à 25 µg/ mg de billes avec une préférence pour 20 µg d'anticorps /mg de billes.

Couplage de 5 mg de billes :

- Prélever 5 mg et les déposer dans un tube eppendorf
- Placer le tube sur aimant et laisser décanter les billes
- Aspirer le surnageant
- Resuspendre les billes avec 200 µl de tampon MES 50 mM pH6,2
- Replacer le tube sur aimant et laisser décanter les billes
- Aspirer le surnageant
- Resuspendre les billes avec 200 µl de tampon MES (2-(N-morpholino) Ethane Sulfonic Acid), 50 mM pH6,2
- Répéter le lavage
- A la fin du lavage, ajouter 100 µg d'anti-glycophorine A
- Après mélange par vortex le tube contenant les billes + l'anticorps est incubé pendant 2 heures à température ambiante sous agitation.
- A la fin de l'incubation le tube est placé sur aimant et le surnageant est retiré.
- Les billes sont alors lavées 3 fois dans le tampon MES 50mM pH6,2
- Les billes sont ensuite saturées dans du PBS+ 0,5% (m/v) BSA (sérum albumine bovine) pendant 2 heures à température ambiante sous agitation
- A la fin de la saturation, le surnageant est retiré en plaçant le tube sur aimant et remplacé par 500µl de PBS (0.3M) + 0,1% (m/v) BSA +0,5 % (m/v) de synpéronic PE/F68, la concentration des billes dans ce tampon est de 1% (m/v).
- Les billes sont conservées à 4°C.

D) Dilution des billes couplées dans le diluant

Une fois les billes couplées à l'anti-GPA, celles-ci sont diluées directement dans le diluant liss Ficoll à 2 % (m/v) qui sera ensuite déposé sur la barrière filtrante. La concentration des billes dans le diluant peut varier entre 0,005 % et 0,02 %, avec une préférence pour 0,004 %.

E) Revêtement de la paroi inclinée et du fond de la cupule ou puits avec une anti-immunoglobuline humaine (AGH)

La nature chimique et physico-chimique du plastique de la cupule ou du puits utilisé permet de recouvrir celui-ci d'une couche d'anti-immunoglobuline humaine (de type AHG monoclonale ou polyclonale) capable de se lier spécifiquement avec les

anticorps des complexes spécifiques éventuellement formés, lorsque l'anticorps dudit complexe est d'origine humaine.

On peut noter en outre que cette composition d'AGH peut comprendre des anticorps dirigés contre des déterminants de protéines sériques de type complément.

Les surfaces de la paroi interne du récipient qui ne sont pas revêtues d'AGH, peuvent être saturées à l'aide des agents saturants classiquement utilisés dans des techniques de type phase solide ou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Par exemple, la solution d'AGH à une concentration comprise entre 1 et 10 µg/ml, peut être préparée en tampon carbonate 0,2 M pH 9,6.

Cette solution est répartie sous un volume de 75 µl dans chaque cupule d'une microplaque à fond rond de type Maxisorp U8 NUNC, puis les plaques sont incubées une nuit à 4°C.

Les cupules sont ensuite lavées à l'aide d'une solution tampon phosphate (PBS 2,5 mM pH 7,4) afin d'éliminer toutes les protéines non adsorbées directement au plastique.

Les cupules 1 sont ensuite traitées à l'aide d'une solution d'albumine à 30 g/l en tampon PBS à raison de 100 µl par cupule.

Après une incubation de 2 heures à température ambiante, les cupules sont à nouveau lavées en tampon phosphate.

EXEMPLE 2 :

1ére méthode : Magnétisation des globules rouges avec les billes couplées à l'anti-GPA (anti-glycophorine A) dans un puits à part

(Voir figure 9 pour le principe général de magnétisation et la figure 10 pour la méthode n° 1)

La détection d'anticorps irréguliers consiste à utiliser des hématies de phénotypes connus dites hématies de panel. Un panel est constitué de trois hématies de phénotypes complémentaires, on utilise une hématie par puits. Dans 3 puits d'une microplaque 96 puits à fond rond, on dépose 5µl de billes couplées à l'anti-GPA, on y rajoute 45 µl de chaque hématie de panel diluée à 1 % dans un tampon de conservation. Après mélange des 2 composants, les hématies sont instantanément magnétisées et prêtes à être utilisées dans la suite du test.

Dans 3 puits d'une microplaque de 96 puits à fond rond, revêtus d'une antiglobuline humaine spécifique (anti-IgG) ou d'un mélange d'antiglobulines humaines (anti-IgG et anti-IgM), une solution visqueuse ou un gel de densité supérieure à 1, est déposée et permet de faire une barrière entre le milieu réactionnel contenant les hématies et le sérum à tester et l'antiglobuline.

Au-dessus de la barrière visqueuse est déposé un diluant de densité supérieure à 1 sur lequel seront déposés les hématies magnétisées via l'anti-GPA, ainsi que le sérum ou le plasma du patient ou du donneur à tester.

Les 3 puits sont alors incubés à 37°C pendant 20 minutes. Pendant ce temps d'incubation les anticorps anti-érythrocytaires présents ou non dans le sérum, vont se fixer aux hématies magnétisées porteuses des antigènes érythrocytaires. A la fin de l'incubation, la microplaque est placée sur un agitateur équipé d'une plaque magnétique. Sous l'effet de l'agitation et du champ magnétique, les hématies magnétisées via l'anti-GPA, portant à leur surface ou non des anticorps anti-érythrocytaires, vont se mouvoir au travers de la barrière filtrante et se fixer ou non à l'antiglobuline humaine au fond du puits. La durée de l'agitation de la microplaque sur la plaque d'aimants est de 5 minutes à 600 rpm (tours par minute).

Dans le cas d'une réaction positive les hématies magnétisées, par l'anti-GPA couplé aux billes magnétiques, et sensibilisées par le sérum (ou plasma) du patient ou du donneur, vont se lier à l'antiglobuline humaine et former un voile au fond du puits. Dans le cas d'une réaction négative, les hématies magnétisées via l'anti-GPA couplé aux billes magnétiques, vont alors former un culot au fond du puits (voir figure 3).

EXEMPLE 3 :

2ème méthode : Magnétisation des globules rouges par les billes couplées à l'anti-GPA au moment de la sensibilisation par le sérum ou plasma. Dépôts successifs de chaque élément

(Voir figure 11)

Dans 3 puits d'une microplaque de 96 puits à fond rond, revêtus d'une antiglobuline humaine spécifique (anti-IgG) ou d'un mélange d'antiglobulines humaines (anti-IgG et anti-IgM), une solution visqueuse ou un gel de densité supérieure, est déposé et permet de faire une barrière entre le milieu réactionnel

contenant les hématies et le sérum (ou plasma) à tester et l'antiglobuline. Au-dessus de la barrière visqueuse est déposé un diluant sur lequel seront déposés les billes magnétiques couplées à l'anti-GPA, puis les hématies diluées à 1 % dans leur tampon de conservation et enfin le sérum ou le plasma du patient (ou du donneur) à tester.

La microplaque est alors incubée à 37°C pendant 20 minutes. Au cours de l'incubation, les billes couplées à l'anti-GPA vont se fixer aux hématies, il en est de même pour les anticorps anti-érythrocytaires présents ou non dans le plasma à tester. Chaque anticorps étant spécifique d'un antigène, la fixation de l'un ne gêne pas la fixation de l'autre. Ainsi les hématies porteuses des antigènes érythrocytaires pourront à la fois être magnétisées et sensibilisées par les anticorps présents dans le plasma du patient.

A la fin de l'incubation, la microplaque est placée sur un agitateur équipé d'une plaque magnétique. Sous l'effet de l'agitation et du champ magnétique, les hématies magnétisées via l'anti-GPA, portant à leur surface ou non des anticorps anti-érythrocytaires, vont se mouvoir au travers de la barrière filtrante et se fixer ou non à l'antiglobuline humaine au fond du puits.

Comme dans le premier cas, une réaction positive donnera lieu à la formation d'un voile au fond du puits, alors qu'une réaction négative donnera un culot bien net au fond du puits.

Dans cette méthode, il n'y pas besoin de réaliser la magnétisation à part, la magnétisation étant spécifique (via l'anticorps anti-GPA) aucun élément ne peut interférer avec la magnétisation et la sensibilisation des hématies par les anticorps présents dans le sérum ou plasma se fait indépendamment.

EXEMPLE 4 :

3ème méthode : Magnétisation des globules rouges par les billes couplées à l'anti-GPA au moment de la sensibilisation par le sérum ou plasma. Dilution des billes magnétiques dans le diluant

(Voir figure 12)

Dans cette méthode, qui est préférée aux 2 autres, les billes sont directement diluées dans le diluant qui sera déposé sur la barrière filtrante. Ainsi le nombre de dépôts est limité et le diluant contenant les billes couplées à l'anti-glycophorine A est considéré comme un réactif.

Comme précédemment, dans 3 puits d'une microplaque de 96 puits à fond rond, revêtus d'une antiglobuline humaine spécifique (anti-IgG) ou d'un mélange d'antiglobulines humaines (anti-IgG et anti-IgM), une solution visqueuse ou un gel de densité supérieure, est déposé et permet de faire une barrière entre le milieu réactionnel contenant les hématies et le sérum à tester et l'antiglobuline. Au-dessus de la barrière visqueuse ou gel, un diluant est déposé contenant déjà les billes magnétiques couplées à l'anti-GPA. Sur le diluant contenant les billes couplées, sont déposées les hématies à 1 % dans leur tampon de conservation et enfin le sérum ou le plasma du patient (ou du donneur) à tester.

Dans un mode de réalisation préféré, les hématies sont préalablement mélangées au diluant contenant les billes couplées à l'anti-GPA, avant d'être déposées sur la barrière visqueuse ou gel de densité supérieure à 1. Puis le plasma ou sérum est ajouté sur le mélange hématies -diluant/billes magnétiques.

Dans un mode de réalisation automatisé, on préférera la façon suivante : dans 3 puits d'une microplaque de 96 puits à fond rond, revêtus d'une antiglobuline humaine spécifique (anti-IgG) ou d'un mélange d'antiglobulines humaines (anti-IgG et anti-IgM) sont déposés des hématies, et le diluant contenant les billes magnétiques. Les 2 constituants sont mélangés en plaçant la microplaque sur un agitateur automatique. A la fin du mélange, les aiguilles de l'automate se plaçant au fond des 3 puits, injectent le gel de densité supérieure sous le mélange hématies /diluant/billes magnétiques. De par sa densité, le gel reste sous le mélange, protégeant ainsi l'AGH du milieu réactionnel, alors que le mélange constitué par les hématies et par le diluant contenant les billes, moins dense, se place au-dessus du gel. On obtient ainsi 2 phases distinctes de densités différentes : la première étant le gel de densité supérieure au-dessus de l'AGH, puis le diluant contenant les billes magnétiques couplées à l'anti-GPA et mélangé aux hématies. Puis le plasma du patient à tester sera déposé au-dessus de ce mélange en dernier.

La microplaque est alors incubée à 37°C pendant 20 minutes. Au cours de l'incubation, les anticorps anti-érythrocytaires présents ou non dans le plasma à tester

vont se fixer aux hématies. Au cours de la sensibilisation les hématies vont sédimenter et entrer en contact avec les billes couplées à l'anti-GPA. Chaque anticorps étant spécifique d'un antigène, la fixation de l'un ne gêne pas la fixation de l'autre. Ainsi les hématies porteuses des antigènes érythrocytaires pourront à la fois être magnétisées et sensibilisées par les anticorps présents dans le plasma du patient.

A la fin de l'incubation, la microplaque est placée sur un agitateur équipé d'une plaque magnétique. Sous l'effet de l'agitation et du champ magnétique, les hématies magnétisées via l'anti-GPA, portant à leur surface ou non des anticorps anti-érythrocytaires, vont se mouvoir au travers de la barrière filtrante et se fixer ou non à l'antiglobuline humaine au fond du puits.

Comme précédemment, une réaction positive donnera lieu à la formation d'un voile au fond du puits, alors qu'une réaction négative donnera un culot bien net au fond du puits.

Toutes ces méthodes de magnétisation, peuvent être déclinées sur d'autres tests, comme le test de compatibilité entre donneur et receveur.

Dans ce cas, les hématies du donneur issues de la poche à transfuser, sont préalablement diluées à 1% dans un tampon de basse force ionique, avant d'être déposées sur le diluant contenant les billes magnétiques couplées à l'anti-GPA.

Il en est de même, pour le test de coombs direct, réalisé chez des patients suspectés d'avoir été sensibilisés in vivo par des anticorps irréguliers. Notamment dans les cas de transfusions incompatibles, d'incompatibilité fœto-maternelle ou de maladies auto-immunes anti-érythrocytaires.

Dans ces cas, les hématies du patient sensibilisées, in vivo, sont diluées préalablement et déposées de la même manière sur la barrière filtrante et le diluant contenant les billes couplées à l'anti-GPA.

EXEMPLE 5 : Réalisation d'un test de détection des anticorps irréguliers utilisant la méthodologie n° 3 (voir Figure 4).

Les billes couplées avec de l'anti-GPA, sont diluées directement dan le diluant, lui-même déposé sur la barrière filtrante. Les hématies sont, soit issues d'un tube

primaire de patient de groupe O et diluées à 1 % dans un tampon de basse force ionique, soit d'un panel de type O, diluées à 1 % dans un tampon de conservation.

L'anti-sérum utilisé (sérum à tester), est issu d'un patient et contient les anticorps irréguliers suivants anti-D +anti-C + anti-E. Cet échantillon est testé à différentes dilutions.

Les résultats attendus ont été réalisés sur une technique commercialisée en utilisant les mêmes hématies et le même anti-sérum.

Protocole :

Dans les puits d'une microplaque 96 puits à fond rond revêtu d'une antiglobuline spécifique des IgG humaines, on dépose 50 µl de barrière filtrante + 50 µl de diluant contenant les billes couplées.

Sur le diluant sont déposés 15 µl d'hématies + 15µl de sérum à tester. La microplaque est ensuite incubée à 37°C pendant 20 minutes, puis placée sur un agitateur muni d'une plaque d'aimants s'ajustant exactement sous chacun des puits de la microplaque. L'agitation a une vitesse de 600 rpm pendant 5 minutes.

EXEMPLE 6 : d'un test de détection d'anticorps irréguliers sur une gamme d'anti-D (voir Figure 5)

Utilisation d'une gamme de dilution d'anti-D étalon du CNRGS (Centre National de Référence des Groupes Sanguins) comme antisérum testée sur des hématies de type O issus d'un panel et diluées à 1 % dans un tampon conservateur.

Cette gamme étalon permet de déterminer la sensibilité du test.

Protocole :

Dans les puits d'une microplaque 96 puits à fond rond revêtu d'une antiglobuline spécifique des IgG humaines, on dépose 50 µl de barrière filtrante + 50µl de diluant contenant les billes couplées.

Sur le diluant sont déposés 15µl d'hématies + 15µl de sérum à tester. La microplaque est ensuite incubée à 37°C pendant 20 minutes, puis placée sur un agitateur muni d'une plaque d'aimants s'ajustant exactement sous chacun des puits de la microplaque. L'agitation a une vitesse de 600 rpm pendant 5 minutes.

Les résultats montrent que le test de détection des anticorps irréguliers est sensible, car capable de détecter jusqu'à 1,25 ng/ml d'anti-D.

Cette technique de magnétisation est donc tout à fait comparable en sensibilité et spécificité, aux techniques déjà commercialisées.

EXEMPLE 7 : Cross match (test de compatibilité) réalisé sur des globules de donneurs de groupe O (voir Figures 6 et 7).

Des tubes primaires, issus de donneurs de groupe O et prélevés sur EDTA, sont testés vis à vis de plasma ou sérum de patients pouvant contenir ou non des anticorps irréguliers anti-érythrocytaires.

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

Protocole :

A partir d'un tube primaire de donneur, 10µl de culot globulaire sont prélevés et dilués dans 1ml de tampon de basse force ionique, pour faire une suspension globulaire à 1%. Dans une microplaque 96 puits à fond rond, revêtue d'une antiglobuline ou d'un mélange d'antiglobuline spécifiques des immunoglobulines humaines, sont déposés 50 µl de barrière filtrante + 50µl de diluant contenant les billes couplées à l'anti-GPA.

Sur le diluant sont déposés 15 µl de suspension globulaire du donneur + 15 µl de sérum ou plasma du receveur à transfuser. La microplaque est incubée pendant 20 minutes à 37°C, puis placée sur un agitateur muni d'une plaque d'aimant piles, en contact direct avec chacun des puits.

L'agitation a une vitesse de 600 rpm pendant 5 minutes.

Les résultats obtenus dans cette technique de magnétisation utilisant des billes magnétiques couplées un anticorps spécifique des globules rouges, permettent clairement de démontrer la possibilité de déterminer la compatibilité sanguine entre un donneur et receveur, comportant des systèmes sanguins différents.

REVENDICATIONS

1. Procédé de mise en évidence d'un complexe spécifique formé par réaction entre un anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin, présent dans une solution et un antigène de groupe ou phénotype sanguin porté par un érythrocyte, ledit érythrocyte étant lié à une particule magnétique, la réaction s'effectuant dans un réacteur ouvert vers le haut et à fond fermé et dont la section diminue au moins dans la zone voisine du fond pour former une paroi inclinée s'étendant jusque dans le fond, ladite paroi inclinée étant au moins en partie revêtu d'une anti-immunoglobuline ou de tout autre composé capable de se lier à l'anticorps dudit complexe formé, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) préalablement à la mise en contact de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes avec la solution susceptible de contenir les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin :

- le remplissage du réacteur avec une substance visqueuse de manière à recouvrir au moins en partie la paroi inclinée du réacteur,

b) la mise en contact au-dessus de la solution visqueuse contenue dans le réacteur de la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps avec la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes ;

c) l'incubation du réacteur pendant un temps donné nécessaire à la formation du complexe entre les particules magnétiques portant les érythrocytes et les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin susceptible d'être contenus dans la solution et de reconnaître spécifiquement lesdits antigènes de groupe ou phénotype sanguin porté par les érythrocytes ;

d) l'application d'un champ magnétique audit réacteur et l'agitation du réacteur, de telle manière que les particules magnétiques soient entraînées vers le fond et/ou la paroi inclinée du réacteur ; et

e) la lecture à l'œil et/ou par tout autre système de lecture appropriée, de l'image obtenue au fond du réacteur et/ou sur la paroi inclinée du réacteur revêtue de ladite anti-immunoglobuline ou de tout autre composé capable de se lier à l'anticorps, cette image obtenue permettant de mettre en évidence la présence ou non de la formation d'un complexe spécifique anticorps/antigène de groupe ou phénotype sanguin,

caractérisé en ce que lesdites particules magnétiques portant les érythrocytes sont des particules magnétiques qui ont été préalablement revêtues d'un anticorps anti-glycophorine A (anti-GPA) et en ce que ledit érythrocyte est lié à ladite particule magnétique par une liaison de type anticorps/antigène.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que préalablement à la mise en contact de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes avec la solution susceptible de contenir les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin, ladite suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes est en suspension dans un diluant dont la densité est supérieure à 1 et inférieure à la densité de ladite solution visqueuse.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites étapes a) et b) sont les suivantes :

a) préalablement à la mise en contact de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes avec la solution susceptible de contenir les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin :

i) la préparation de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes à l'extérieur dudit réacteur,

ii) le remplissage du réacteur avec une substance visqueuse de manière à recouvrir au moins en partie la paroi inclinée du réacteur, puis avec ledit diluant ;

b) la mise en contact au-dessus du diluant de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes préparée à l'étape a)i) avec la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites étapes a) et b) sont les suivantes :

a) préalablement à la mise en contact de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes avec la solution susceptible de contenir les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin :

- le remplissage du réacteur avec une substance visqueuse de manière à recouvrir au moins en partie la paroi inclinée du réacteur, puis avec ledit diluant puis avec la suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA puis de la suspension d'érythrocytes ;

b) la mise en contact dans le réacteur de la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps avec la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes formée ou en cours de formation.

5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce lesdites étapes a) et b) sont les suivantes :

a) préalablement à la mise en contact de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes avec la solution susceptible de contenir les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin :

i) la préparation à l'extérieur dudit réacteur d'une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA, lesdites particules magnétiques étant en suspension dans ledit diluant, ou la mise à disposition d'une telle suspension déjà préparée,

ii) le remplissage du réacteur avec une substance visqueuse de manière à recouvrir au moins en partie la paroi inclinée du réacteur, puis avec une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA dans ledit diluant préparée à l'étape a)i), puis de la suspension d'érythrocytes ;

b) la mise en contact dans le réacteur de la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps avec la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes formée ou en cours de formation.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que :

- à la fin de l'étape a)i), on met ensuite en contact ladite suspension comprenant lesdites particules magnétiques en suspension dans ledit diluant avec la suspension d'érythrocytes à l'extérieur du réacteur pour former une suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes en suspension dans ledit diluant ; et

-à l'étape a)ii) le remplissage du réacteur avec une substance visqueuse de manière à recouvrir au moins en partie la paroi inclinée du réacteur, puis avec ladite suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes en suspension dans ledit diluant ;

b) la mise en contact dans le réacteur de la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps avec la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes.

7. Procédé selon la revendication 5, de manière préférée dans le cadre d'une automatisation de la distribution par un automate de laboratoire, caractérisé en ce que lesdites étapes a) et b) sont les suivantes :

a) préalablement à la mise en contact de la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes avec la solution susceptible de contenir les anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin :

i) la préparation à l'extérieur dudit réacteur d'une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA, lesdites particules magnétiques étant en suspension dans ledit diluant, ou la mise à disposition d'une telle suspension déjà préparée,

ii) le remplissage du réacteur avec la suspension d'érythrocytes, puis avec une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA dans ledit diluant préparée à l'étape a)i), puis, le cas échéant après agitation, avec ladite substance visqueuse de manière à recouvrir avec substance visqueuse au moins en partie la paroi inclinée du réacteur, ladite substance visqueuse étant injectée au fond du réacteur ;

b) la mise en contact dans le réacteur de la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps avec la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes formée ou en cours de formation.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'application d'un champ magnétique audit réacteur et l'agitation du réacteur sont réalisées simultanément.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'application du champ magnétique et l'agitation sont réalisées simultanément pendant une durée comprise entre 2,5 min. et 10 min., de préférence pendant une durée comprise entre 5 min. et 6 min..

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'application du champ magnétique est réalisée au moyen d'un aimant situé à l'extérieur sous le réacteur de telle manière que les particules magnétiques soient entraînées au fond du réacteur.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'à l'étape d) ledit aimant est un aimant permanent de magnitude comprise entre 10 000 et 14 000 gauss.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'agitation est réalisée au moyen d'un agitateur rotatif.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'à l'étape d), l'agitation est effectuée à une vitesse comprise entre 250 et 750 trs/min, de préférence à 600 trs/min.

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'à l'étape c), la durée d'incubation est comprise entre 10 min. et 30 min. à une température comprise entre 20°C et 40°C, de préférence à une température de 37°C ± 1°C.

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que les particules magnétiques ont un diamètre compris entre 100 nm et 3,0 µm, de préférence entre 200 nm et 1,5 µm.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que lesdites particules magnétiques contiennent au moins 40 % en poids au moins de composés ferromagnétiques.

17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que ladite substance visqueuse est une substance visqueuse de densité supérieure à 1.

18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que ladite substance visqueuse est choisi parmi les gels, de préférence choisie parmi les gels dérivés de dextran Sephadex™ ou de Sepharose™ dont le diamètre des billes peut varier de 20 nm à 300 nm, de préférence du G-100™ superfine ou du Sepharose™ 4B ou 6B, parmi le PVP (polyvinylpyrrolidone), PVP-40 ou PVP-60, ou encore parmi des solutions d'albumine à 30 % ± 10 %.

19. Procédé selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce qu'à l'étape b), la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps peut être déposée avant la suspension d'érythrocytes lorsque cette dernière est déposée après la solution visqueuse et après ledit diluant.

20. Procédé selon l'une des revendications 1 à 19 caractérisé en ce que ledit diluant a comme densité, une densité inférieure à la densité de ladite solution visqueuse et supérieure à la densité de la solution contenant ou susceptible de contenir ledit anticorps.

21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisé en ce que le réacteur est une cupule de microplaque à fond rond ou à fond V.

22. Procédé selon l'une des revendications 1 à 21, caractérisé en ce que la solution d'anticorps est un échantillon de plasma ou de sérum humain dans lequel on cherche à mettre en évidence la présence d'un anticorps dirigé spécifiquement contre un antigène de groupe ou de phénotype sanguin, et en ce que l'anti-immunoglobuline est une anti-immunoglobuline humaine (AGH).

23. Procédé selon l'une des revendications 1 à 22, pour la recherche et d'agglutinines irrégulières (RAI) dans un échantillon de sérum ou plasma, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle les érythrocytes portés par les billes magnétiques sont des érythrocytes de groupe O.

24. Procédé selon l'une des revendications 1 à 23, caractérisé en ce que la concentration d'érythrocytes dans la suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes est comprise entre 0,2 % et 2,5 %, de préférence comprise entre 0,5 % et 1,5 %, de préférence 1 % ± 0,3 %.

25. Procédé selon l'une des revendications 1 à 23, caractérisé en ce que la concentration de particules magnétiques dans ladite suspension de particules magnétiques portant les érythrocytes est comprise entre 0,2 % et 2,5 %, de préférence comprise entre 0,5 % et 1,5 %, de préférence 1 % ± 0,3 %.

26. Procédé selon l'une des revendications 1 à 25, caractérisé en ce que l'anticorps anti-GPA est un anticorps de mammifère, de préférence d'origine murine ou humaine, et capable de reconnaître spécifiquement la glycophorine A humaine portée par les érythrocytes, de préférence dirigé contre la sialoglycoprotéine glycophorine A, de préférence contre son domaine extramembranaire.

27. Procédé selon la revendication 26, caractérisé en ce que l'anticorps anti-GPA est un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope de la partie extracellulaire de la sialoglycoprotéine glycophorine A, ledit épitope ne portant pas tout ou partie de l'antigène M ou N, notamment ledit épitope ne comprenant pas le fragment aa1-5 N-terminal de la glycophorine A.

28. Procédé selon l'une des revendications 1 à 27, caractérisé en ce que l'anticorps anti-GPA est couplé aux particules magnétiques à une concentration comprise entre 5 µg/mg à 25 µg/mg de particules magnétiques, de préférence à 20 µg/mg ± 3 µg/mg de particules magnétiques.

29. Procédé selon l'une des revendications 1 à 28, caractérisé en ce que ledit diluant est une solution comprenant un polymère hydrophile à une concentration permettant d'ajuster sa densité à une densité comprise entre celle du plasma ou sérum et celle de ladite solution visqueuse.

30. Procédé selon l'une des revendications 1 à 29, caractérisé en ce que ledit diluant est une solution comprenant un polymère hydrophile polysaccharidique, de préférence

du Ficoll™, notamment du Ficoll™ 400, à une concentration comprise entre 1 % et 2,5 % (m/v), de préférence à 2 % ± 0,3 %.

31. Procédé selon l'une des revendications 1 à 30, caractérisé en ce que ladite suspension de particules magnétiques est à une concentration comprise entre 0,004 % et 0,02 % (m/v).

32. Procédé selon l'une des revendications 1 à 31, caractérisé en ce que ladite suspension de particules magnétiques est une suspension comprenant un détergent non ionique, de préférence du synpéronic™ PE/F68, du Tween™ (20, 40 ou 80) à une concentration comprise entre 0,1 % et 1 % (m/v), de préférence 0,25 % et 0, 75 % (m/v), ou 0,5 % ± 0,15 %.

33. Kit pour la mise en évidence d'un complexe spécifique formé par réaction entre un anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin, présent dans une solution et un antigène de groupe ou phénotype sanguin porté par un érythrocyte , notamment pour la RAI ou pour réaliser un test de compatibilité ou pour un test de Coombs direct, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un réactif comprenant une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA, dans ledit diluant telle que défini dans l'un des procédés selon l'une des revendications 1 à 32, en particulier dans un diluant étant une solution comprenant un polymère hydrophile, de préférence de nature polysaccharidique, de préférence du Ficoll™, notamment du Ficoll™ 400, à une concentration comprise entre 1 % et 2,5 % (m/v), de préférence à 2 % ± 0,3 %.

34. Kit pour la mise en évidence d'un complexe spécifique formé par réaction entre un anticorps anti-antigène de groupe ou phénotype sanguin, présent dans une solution et un antigène de groupe ou phénotype sanguin porté par un érythrocyte , notamment pour la RAI ou pour réaliser un test de compatibilité , caractérisé en ce qu'il comprend :

a) un réactif comprenant une suspension de particules magnétiques revêtues d'anti-GPA, dans un diluant, ledit diluant étant une solution comprenant un polymère hydrophile, de préférence de nature polysaccharidique, de préférence du Ficoll™, notamment du Ficoll™ 400, à une concentration comprise entre 1 % et 2,5 % (m/v), de préférence à 2 % ± 0,3 %,

b) le cas échéant, un réacteur ou un ensemble de réacteurs ouvert vers le haut et à fond fermé et dont la section diminue au moins dans la zone voisine du fond pour former une

paroi inclinée s'étendant jusque dans le fond, ladite paroi inclinée étant au moins en partie revêtue d'une anti-immunoglobuline ou de tout autre composé capable de se lier à l'anticorps dudit complexe formé,

c) le cas échéant, un container contenant une solution visqueuse, ou le cas échéant, chacun des réacteurs étant rempli en partie de ladite substance visqueuse, ladite substance visqueuse étant telle que définie dans l'un des procédés selon l'une des revendications 1 à 32 ; et,

d) le cas échéant, au moins un aimant ou un ensemble d'aimants pouvant être disposé à l'extérieur sous le ou les réacteurs couplé(s) à un agitateur rotatif.

35. Kit selon la revendication 33 ou 34, pour la RAI, caractérisé en ce qu'il contient une suspension d'érythrocytes tests de phénotype connu sur lesquels érythrocytes seront couplés auxdites particules magnétiques de la suspension, de préférence la suspension d'érythrocytes est de groupe O, et à concentration comprise entre 0,2 % et 2,5 %, de préférence comprise entre 0,5 % et 1,5 %, de préférence 1 % ± 0,3 %.

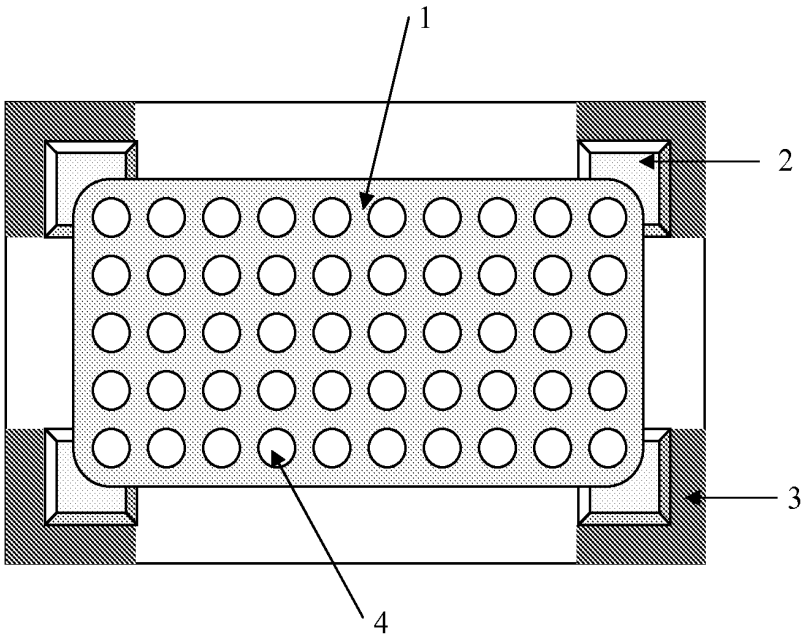


FIGURE 1A

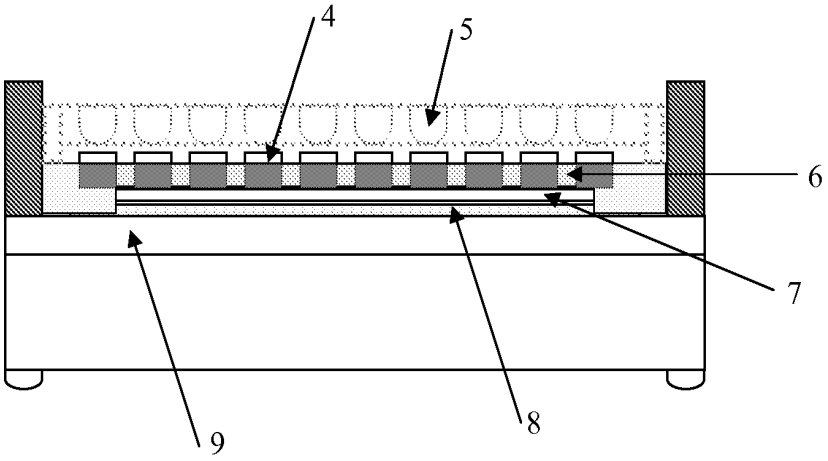


FIGURE 1B

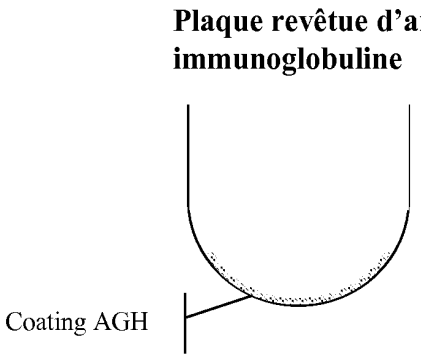


FIGURE 2A

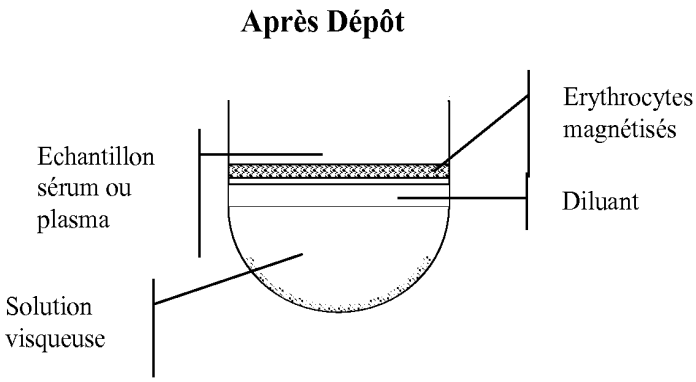


FIGURE 2B

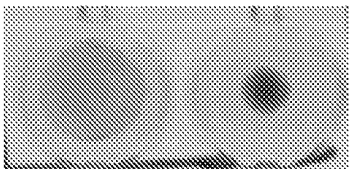


FIGURE 3

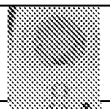
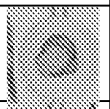
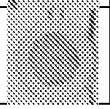
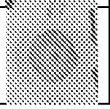
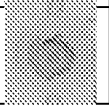
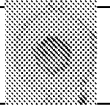
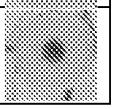
	Anti-D,C,E au 1/2	Anti-D,C,E au 1/4	Anti-D,C,E au 1/8	Anti-D,C,E au 1/16	Anti-D,C,E au 1/32	Anti-D,C,E au 1/64	Anti-D,C,E au 1/128	Plasma AB
Résultats Attendus	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	Neg
Résultats obtenus sur hématie O de panel								
Résultats obtenus sur globule O de patient								

FIGURE 4

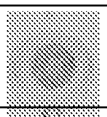
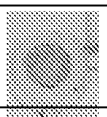
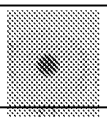
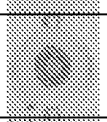
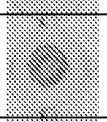
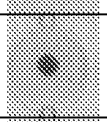
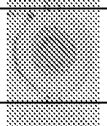
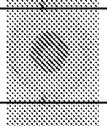
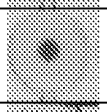
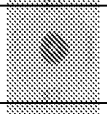
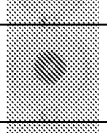
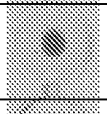
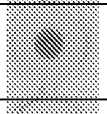
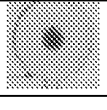
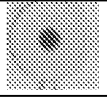
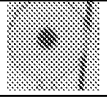
Anti-D étalon	RBC O1 (R1R1)	RBC O2 (R2R2)	RBC O3 (rr)
Anti-D 20 ng/ml			
Anti-D 10 ng/ml			
Anti-D 5 ng/ml			
Anti- D 2,5 ng/ml			
Anti-D 1,25 ng/ml			
Négatif			

FIGURE 5

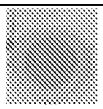
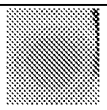
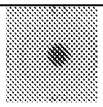
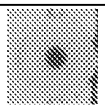
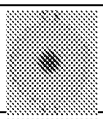
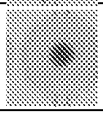
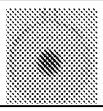
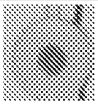
Antisérum	Donneur	Résultats attendus	Résultats obtenus	Compatibilité transfusionnelle
Anti- D+C+E	O (DCee)	3+		Incompatible
	O (DCcEe)	3+		Incompatible
Anti-K	O (DCee)	Neg		Compatible
	O (DCcEe)	Neg		Compatible
Anti-E	O (DCee)	Neg		Compatible
	O (DCcEe)	1+		Incompatible
AntiJka	O (DCee)	Neg		Compatible
	O (DCcEe)	1+		Incompatible

FIGURE 6

Antisérum	Donneur	Résultats attendus	Résultats obtenus	Compatibilité transfusionnelle
Receveur 1	O 1	Neg		Compatible
Receveur 2	O 2	Neg		Compatible
Receveur 3	O 3	Neg		Compatible
Receveur 4	O 4	Neg		Compatible
Receveur 5	O 5	Neg		Compatible
Receveur 6	O 6	Neg		Compatible
Receveur 7	O 7	Neg		Compatible
Receveur 8	O 8	Neg		Compatible

FIGURE 7

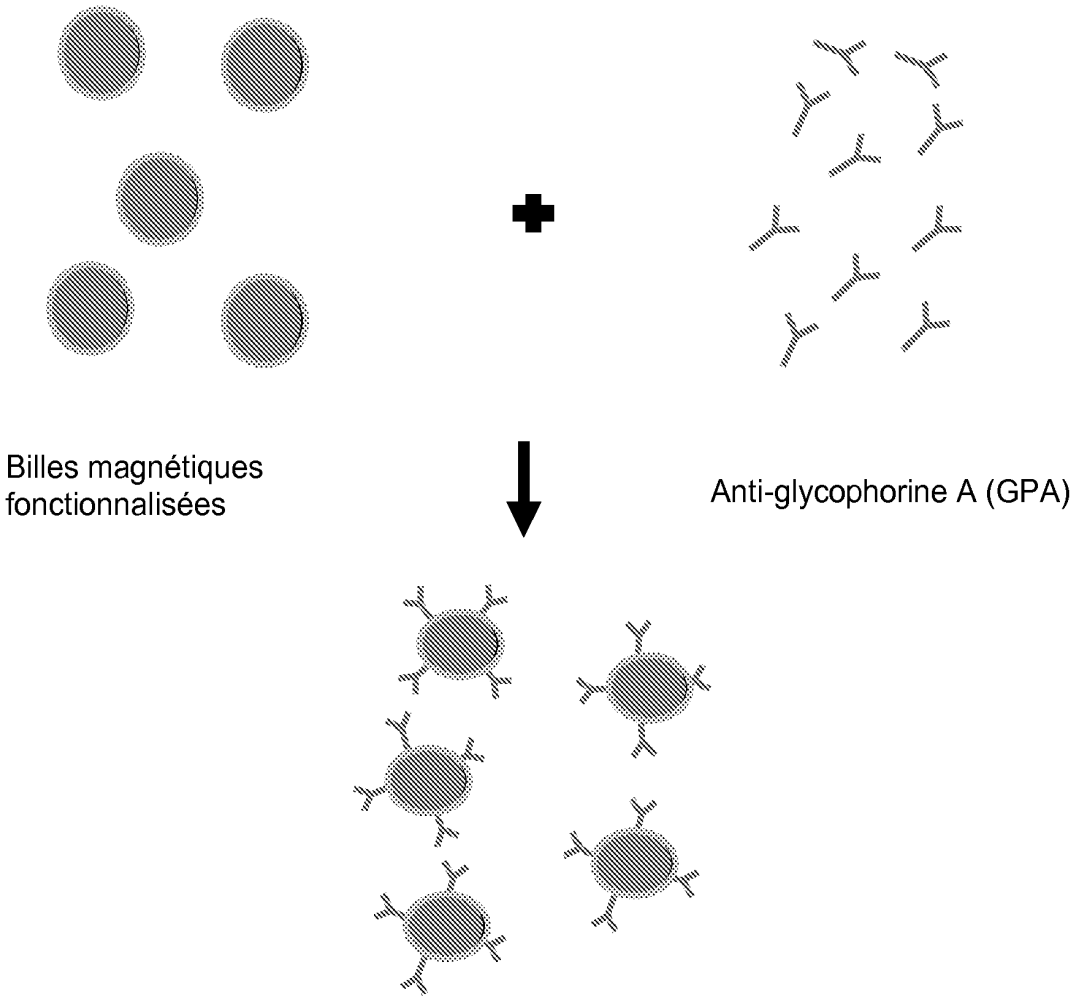

Billes magnétiques
fonctionnalisées
Anti-glycophorine A (GPA)
Billes couplées à l'anti-GPA

FIGURE 8

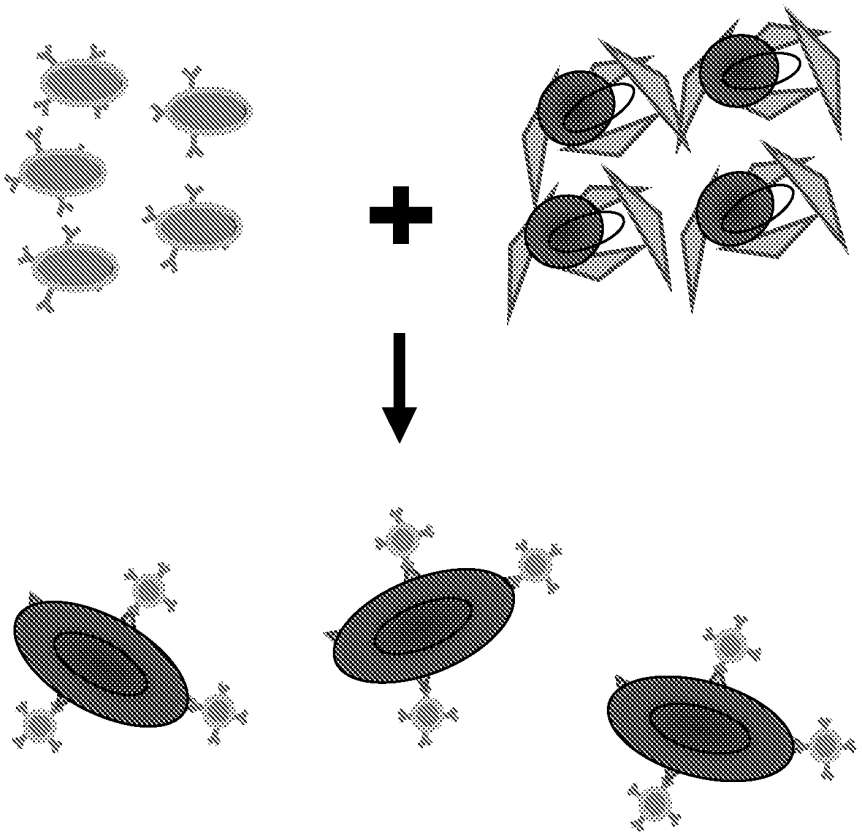
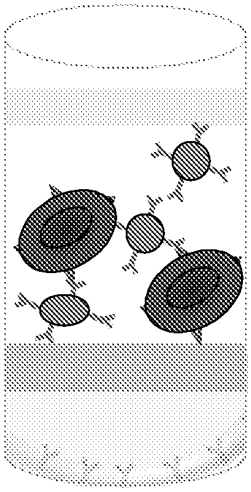
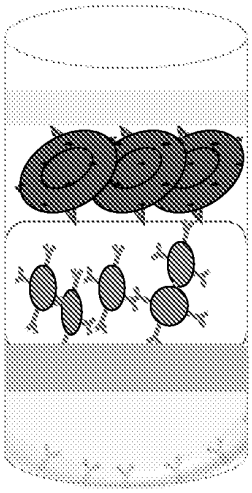


FIGURE 9



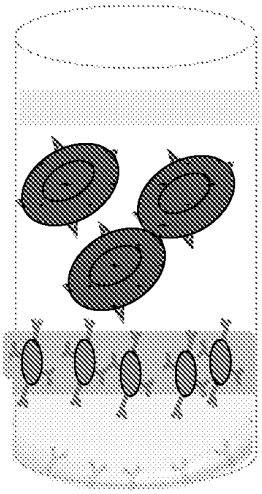
1ère méthode de magnétisation

FIGURE 10



2ème méthode de magnétisation

FIGURE 11



3ème méthode de magnétisation

FIGURE 12

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement national

FA 744460
FR 1055973

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 96/09409 A1 (MILTENYI BIOTECH INC [US]) 28 mars 1996 (1996-03-28) * le document en entier * * page 12, ligne 27 - page 13, ligne 1 * -----	33-35	G01N33/543 G01N33/80
Y,D	WO 2007/051844 A1 (DIAGAST [FR]; BARBREAU YVES [FR]; BOULET OLIVIER [FR]; BOULET ARNAUD [) 10 mai 2007 (2007-05-10) * le document en entier * * exemple 2 * -----	1-32	
Y	WO 2007/092028 A2 (MEDICAL DISCOVERY PARTNERS LLC [US]; OLKEN SARAH K [US]; BOGEN STEVEN) 16 août 2007 (2007-08-16) * le document en entier * -----	1-32	
Y	WO 00/73794 A2 (STEMCELL TECHNOLOGIES INC [CA]; THOMAS TERRY E [CA]; PETERS CARRIE [CA) 7 décembre 2000 (2000-12-07) * le document en entier * * page 7, ligne 32 - page 8, ligne 3 * * exemple 2 * -----	1-32	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			G01N

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
28 février 2011	Stricker, J

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

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 bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1055973 FA 744460

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 28-02-2011
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9609409 A1	28-03-1996	AU 691040 B2	07-05-1998
		AU 3593595 A	09-04-1996
		CA 2200294 A1	28-03-1996
		EP 0778899 A1	18-06-1997
		JP 10507632 T	28-07-1998
WO 2007051844 A1	10-05-2007	EP 1957978 A1	20-08-2008
		FR 2892820 A1	04-05-2007
		JP 2009515179 T	09-04-2009
		US 2009269776 A1	29-10-2009
WO 2007092028 A2	16-08-2007	AT 490462 T	15-12-2010
		EP 1871870 A2	02-01-2008
		US 2009081632 A1	26-03-2009
WO 0073794 A2	07-12-2000	AT 292282 T	15-04-2005
		AU 769903 B2	05-02-2004
		AU 4905900 A	18-12-2000
		CA 2375115 A1	07-12-2000
		CN 1367876 A	04-09-2002
		DE 60019111 D1	04-05-2005
		DE 60019111 T2	26-01-2006
		EP 1185867 A2	13-03-2002
		HK 1044819 A1	29-07-2005
		IL 146660 A	31-10-2007
		JP 4526749 B2	18-08-2010
		JP 2003501629 T	14-01-2003

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82