

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 08356

(54) Dispositif de désagrégation pour suspensions de cellules.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ⁸). C 12 M 3/00.

(22) Date de dépôt..... 13 mai 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : EUA, 14 mai 1981, n° 263.711.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 46 du 19-11-1982.

(71) Déposant : Société dite : COULTER ELECTRONICS, INC., résidant aux EUA.

(72) Invention de : David J. Zahniser et Marshall D. Graham.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Z. Weinstein,
20, av. de Friedland, 75008 Paris.

La présente invention se rapporte à des dispositifs de désagrégation pour des suspensions cellulaires afin de préparer des échantillons pour une analyse subséquente.

La désagrégation des amas de cellules dans des échantillons de tissus, prélèvements et fluides corporels est souvent souhaitable pour une analyse visuelle et elle a une extrême importance pour une analyse quantitative, en particulier si l'on utilise des dispositifs automatisés. Différentes techniques, aussi bien mécaniques que chimiques, ont été tentées pour désagréger les amas de cellules. Pour certaines applications, en particulier dans les cultures de cellules, les techniques chimiques fonctionnent bien. Cependant, pour de nombreuses applications, ces techniques sont trop agressives. Les méthodes mécaniques qui ont été utilisées comprennent des secousses et une agitation, une filtration forcée, une homogénéisation, un passage à la seringue et une agitation par ultrasons comme le montrent les articles qui suivent :

- 1) Garcia, G.L., et Tolles, W.E., "Ultrasonic disaggregation of cell clusters", J. Histochem, Cytochem., 25:508, 1977 ;
- 2) Mayall, B.H., "Monodisperse cell samples : the problem and possible solutions", dans The Automation of Uterine Cancer Cytology, édité par G.L. Wied, G.F. Bahr, et P.H. Bartels, Chefs de travaux de Cytologie, Chicago, 1976, page 61 ;
- 3) Miller, F. "Cytopreparatory methods : collection smearing, staining, screening, reporting", Compendium of Cytopreparatory Techniques, édité par C.M. Keebler, J.W. Reagan, et G.L. Wied, Chefs de travaux de Cytologie, Chicago, 1976, page 59 ;
- 4) Wheelless, L.L., Jr., et Onderdonk, M.A., "Preparation of Clinical gynecologic specimens for automated analysis : an overview", J. Histochem, Cytochem., 22:522, 1974 ; et
- 5) Rosenthal, D.L. Stern, E., McLatchie, C., Wu, A., Lagasse, L.D., Wall, R., et Castleman, K.R., "A Simple Method of Producing a Monolayer of Cervical Cells for Digital Image Processing", Anal. Quant. Cytol., 1:84, 1979.

Parmi toutes les méthodes possibles décrites par ces articles, l'utilisation de la seringue est sans aucun doute la méthode la plus réussie de désagrégation des cellules actuellement connue. Par ce moyen, la suspension des
5 cellules est forcée de façon répétée à travers une aiguille de seringue. Les forces de cisaillement au bout de l'aiguille sont suffisamment fortes pour séparer les amas de cellules.

La présente invention est dirigée vers un dispositif
10 de désagrégation pour séparer des amas des cellules biologiques dans une suspension d'un échantillon, le dispositif comprenant un bécber contenant la suspension de l'échantillon, un rotor monté rotatif à l'intérieur du bécber et un moyen pour faire tourner le rotor à une
15 vitesse suffisante pour créer des forces de cisaillement sur les amas de cellules qui se trouvent dans la suspension de l'échantillon entre le rotor et le bécber. Dans une modification du dispositif, une fiole interne concentrique peut être placée au fond du bécber entre le rotor et la
20 paroi interne du bécber, pour permettre de récupérer les fractions des densités différentes. Dans une autre modification du dispositif, une cavité interne peut être formée dans le rotor avec un certain nombre de trous qui traversent le rotor afin de permettre à la force centrifuge de pousser le liquide de la cavité à travers les trous.
25 Dans une autre modification du dispositif, le rotor peut être pourvu d'une surface externe hélicoïdale en forme de vis sans fin, et est placé à l'intérieur d'un capuchon ayant un certain nombre de trous de grand diamètre qui sont placés à une région supérieure et un certain nombre
30 de trous de petit diamètre placés à une région inférieure.

En vertu du dispositif selon l'invention, on peut obtenir des productions élevées de cellules simples, sans dégradation sensible supplémentaire des cellules due à la
35 technique, en des temps bien plus courts que ceux pouvant être précédemment obtenus par les techniques selon l'art antérieur.

L'invention sera mieux comprise, et d'autres buts, caractéristiques, détails et avantages de celle-ci apparaîtront plus clairement au cours de la description explicative qui va suivre faite en référence aux dessins schématiques annexés donnés uniquement à titre d'exemple illustrant
5 plusieurs modes de réalisation de l'invention, et dans lesquels :

- la figure 1 est une vue en perspective d'un premier mode de réalisation d'un dispositif de désagrégation selon
10 l'invention ;

- la figure 2 est une vue en perspective fragmentée d'une première modification du dispositif de désagrégation de la figure 1 ;

- la figure 3 est une vue en coupe transversale d'une
15 seconde modification du mode de réalisation de la figure 1, où la coupe transversale est prise par rapport aux lignes de coupe 3.- 3 de la figure 4 ;

- la figure 4 est une vue en coupe transversale de
20 dessus de la modification de la figure 3 suivant la ligne 4.- 4 ; et

- la figure 5 est une vue latérale d'une autre modification du dispositif de désagrégation de la figure 1.

Un dispositif de désagrégation, généralement indiqué par le repère 10, est illustré sur la figure 1 et il sert
25 à désagréger ou à séparer des amas de cellules dans des échantillons de tissus, prélèvements et fluides corporels.

Les cellules désagrégées peuvent subséquentement être utilisées dans de nombreux usages courants, comme la disposition des cellules en couche sur des lamelles d'un
30 microscope pour une analyse visuelle subséquente au moyen de microscopes ou par une analyse avec des systèmes automatisés de reconnaissance de motifs et pour des systèmes à écoulement continu.

Le dispositif de désagrégation 10 comprend un rotor
35 12 en forme de tambour qui peut fonctionner pour tourner rapidement à l'intérieur d'un béccher rond 14 ou récipient analogue . Le rotor 12 et le béccher 14 ont de préférence des formes cylindriques, mais ils peuvent prendre d'autres

formes, comme des configuration en cône. Le b cher 14 est adapt   à contenir l'échantillon de cellules dans une suspension liquide 16. Le rotor 12 est coupl   rigide ment à un moteur électrique 18 par un arbre 20. Le moteur électrique est à son tour électriquement coupl   à une source de courant (non repr sent  ) pour exciter le moteur électrique pour faire tourner le rotor 12. Le moteur électrique 18 a un logement 22 avec une partie formant col 24 qui s'étend vers le bas à partir des extr mit  s inférieures du logement. La partie formant col est adapt  e à s'ajuster coulissante dans le sommet du b cher 14, de façon que le logement 22 repose sur le b cher 14 qui le supporte. De préférence, mais cela n'est pas nécessaire, une ou plusieurs saillies 23 sont plac  es à la partie supérieure du rotor 12 pour aider à empêcher la suspension liquide 16 de remonter le long de la paroi interne du b cher 14.

De préférence, mais cela n'est pas nécessaire, le b cher 14 est en matière plastique, le rotor 12 est en matière plastique, l'arbre 20 est en métal et le logement 22 et la partie formant col 24 sont en matière plastique. Comme groupe illustr   de dimensions, la surface du rotor 12 est espac  e de la paroi intérieure du b cher d'environ 4 mm. Le diamètre du rotor 12 peut, par exemple, être de 17 mm et le diamètre interne du b cher peut être de 25 mm.

Le rotor 12 est espac   du fond du b cher 14 de 1 mm et la hauteur verticale du rotor 12 est de 14,5 mm jusqu'aux saillies 23, les deux saillies 23 ajoutant encore 5 mm de hauteur. Le diamètre des saillies 23 est de 20 mm. Typiquement, la suspension liquide 16 peut être de 9 ml, donc le niveau du liquide s'étend au dessus du rotor 12 sur 3 mm. Ces valeurs ne sont donn  es qu'à titre d'exemple, et elle peuvent sensiblement varier. Par exemple, des espaces de l'ordre de 1 cm ont  t   utilis  s entre le rotor 12 et le b cher 14, avec pour résultat la désagrégation souhait  e des cellules. En utilisation, le rotor 12 tourne rapidement, cr  ant des forces de cisaillement entre sa paroi externe

et la paroi interne du b cher 14. Ces forces de cisaillement sont suffisantes pour rompre les amas de cellules sans endommager de façon importante les cellules elles-mêmes. On pense que ces forces de cisaillement sont créées dans une région immédiatement adjacente à la paroi du rotor 12. Le rotor 12 peut être entraîné en rotation, par exemple, entre 2000 et 6000 t/mn. En général, plus la rotation est rapide, meilleurs sont les résultats, avec des vitesses de rotation inférieures à 2000 t/mn généralement inacceptables. Des essais utilisant le dispositif ont montré une diminution sensible du temps requis pour désagréger les cellules, en comparaison au passage traditionnel à la seringue d'une suspension de cellules. Pour l'application du dispositif de désagrégation 10 à des échantillons cervicaux, on a obtenu des productions de 80 à 90 % de cellules simples, sans d gat des cellules. Ces résultats ont été obtenus en 30 secondes d'usage du rotor. Des résultats semblables à la seringue nécessitent une durée de désagrégation de 10 à 15 minutes. Le dispositif 10 est bien adapté à une utilisation dans un dispositif automatisé de préparation d'échantillons. Le rotor 12 est facile à nettoyer en le faisant fonctionner dans un bain d'eau courante.

Bien qu'un moteur électrique 18 soit illustré dans le mode de réalisation préféré, d'autres moyens pour amener de l'énergie pour faire tourner le rotor sont possibles. Par exemple, un entraînement compact à turbine à air peut être facilement utilisé à la place du petit moteur électrique 18.

La figure 2 montre l'adaptation du dispositif de désagrégation 10 pour permettre de récupérer des fractions de densités différentes. Le b cher 14 est modifié pour former un b cher à double compartiment , par inclusion d'une fiole interne concentrique 26. La fiole interne 26 peut s'étendre jusqu'à une position située en dessous ou au dessus du fond du rotor 12. De préférence, le sommet de la fiole interne 26 est placé légèrement en dessous du fond de rotor 12. En choisissant l'emplacement de la

paroi entre les compartiments et la hauteur de la fiole 26, il est possible de recueillir des composants de la suspension liquide ayant des densités différentes, du fait de l'action centrifuge du rotor 12. Par ailleurs, il est envisagé qu'avec un certain nombre de fioles internes concentriques 26 prévues le long du fond du bêche 14, il soit possible de séparer l'échantillon en plus de deux fractions.

Les figures 3 et 4 montrent une autre modification du mode de réalisation de la figure 1. Le rotor 12 a une cavité centrale et annulaire 28 qui est formée, avec un certain nombre de trous 30 qui s'étendent de la cavité 28 jusqu'à une paroi externe 32 du rotor. Chacun des trous 30 a une partie cylindrique allongée 34 et une partie en forme de tronc de cône et évasée 36. De nouveau, la paroi 32 du rotor 12 est espacée de la paroi interne du bêche 14 d'une distance semblable à celle représentée sur la figure 1. Chacun des trous 30 est aligné de façon que son axe central soit tangent à un cercle imaginaire qui est concentrique à l'arbre 20, comme le montre la figure 4. Les cellules à désagréger sont attirées de la cavité 28 à travers les trous 30 par la force centrifuge créée par le rotor 12 en rotation. En d'autres termes, cet agencement fonctionne comme une pompe centrifuge. En plus de produire la force de cisaillement décrite jusqu'à maintenant entre la paroi externe 32 du rotor 12 et la paroi interne du bêche 14, une force supplémentaire de cisaillement est produite à l'éjection de la matière cellulaire à travers les trous 30. Par conséquent, les mouvements des cellules à travers les trous 30 favorise la désagrégation des cellules provoquée par la force de cisaillement entre les parois.

La figure 5 montre un mode de réalisation du dispositif de désagrégation 10 où le rotor a une découpe hélicoïdale 38 qui définit une configuration extérieure en vis sans fin. Le bêche 14 est pourvu de plus grandes dimensions en coupe transversale par rapport aux dimensions du bêche des modes de réalisation qui précèdent. Un manchon fermé

ou capuchon 40 est interposé entre le rotor 12 et le b cher 14. Plus particulièrement, le moteur électrique 18 repose maintenant sur le sommet du capuchon 40. Le capuchon 40 a une extrémité fermée 42 qui repose au fond du b cher 14. Un certain nombre de trous 44 de petit diamètre traversent le capuchon à ses régions inférieures vers l'extrémité inférieure du rotor 12. Un certain nombre de trous 46 de grand diamètre traversent le capuchon 40 dans une région à proximité du rotor 12.,.

De préférence, mais cela n'est pas nécessaire, une saillie 47 est montée sur le b cher 14 à une hauteur à proximité du sommet de l'échantillon liquide pour empêcher la suspension liquide de remonter le long des parois. Avec la direction de la découpe hélicoïdale 38 représentée sur la figure 5, la rotation dans le sens des aiguilles d'une montre, en regardant en dessous, du rotor 12, force le liquide vers le bas, vers le fond du capuchon 40. En vertu de cet agencement, le liquide du b cher 14 est attiré à travers les trous 46 de grand diamètre , et est forcé à descendre vers le fond du capuchon 40 et passe vers l'extérieur à travers les trous 44 de petit diamètre . En plus de la force de cisaillement cr e e entre la surface en forme de vis sans fin du rotor 12 et la paroi interne du b cher 14, des forces supplémentaires de cisaillement sont cr e es tandis que le liquide jaillit par les trous 44 de petit diamètre . Par ailleurs, en comparaison à l'agencement des figures 3 et 4, la rotation de la découpe hélicoïdale 38 permet le développement de pressions sensiblement plus importantes pour forcer les cellules à travers les trous 44. Plus particulièrement, la combinaison de la force de cisaillement du rotor 12 et des trous 44 dans le capuchon 40 permet une désagrégation excellente avec une amélioration pouvant atteindre 10 % par rapport au dispositif à rotor de base représenté sur la figure 1. Cette pression ajoutée peut également être utile pour extraire le cytoplasme des noyaux des cellules.

R E V E N D I C A T I O N S

1. Dispositif de désagrégation pour séparer des amas de cellules biologiques dans une suspension d'un échantillon, du type comprenant un béccher contenant ladite suspension, caractérisé par un rotor (12) monté rotatif à l'intérieur dudit béccher (14) ; et un moyen de rotation (18, 20) pour faire tourner ledit rotor afin de créer des forces de cisaillement pour désagréger lesdits amas de cellules dans ladite suspension de l'échantillon (16) entre ledit rotor et ledit béccher.
2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la surface externe du rotor (12) précité et la paroi interne du béccher (14) précité ont des configurations en coupe transversale annulaire.
3. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le rotor (12) précité a une extrémité inférieure qui est placée en relation espacée avec le fond du béccher (14) précité.
4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé par une fiole interne (26) qui est placée entre le rotor précité et le béccher précité au fond dudit béccher.
5. Dispositif selon la revendication 4, caractérisé en ce que la fiole interne (26) précitée a une configuration en coupe transversale circulaire et est placée en relation concentrique avec le béccher (14) précité et le rotor (12) précité et en ce que ladite fiole a une hauteur qui s'étend vers le haut jusqu'à proximité de l'extrémité inférieur dudit rotor.
6. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que le rotor (12) précité a une cavité (28) qui y est formée ; en ce qu'un certain nombre de trous (30) traversent ledit rotor, lesdits trous s'étendant de la cavité jusqu'à la surface externe dudit rotor ; ainsi la rotation dudit rotor crée une force centrifuge qui déplace l'échantillon de ladite cavité à travers lesdits trous.

7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ou 3 caractérisé de plus par un capuchon (40) placé à l'intérieur du bécher (14) précité, ledit capuchon ayant un certain nombre de trous (44) d'un diamètre relativement petit et un certain nombre de trous (46) d'un diamètre relativement grand, traversant tous la paroi dudit capuchon, lesdits trous de grand diamètre (46) étant placés au-dessus desdits trous de petit diamètre (44); et en ce que le rotor (12) précité a, sur sa surface, une découpe hélicoïdale (38); ainsi la rotation dudit rotor tire la suspension de l'échantillon à travers lesdits trous de grand diamètre et pousse la suspension de l'échantillon vers le bas à l'intérieur dudit capuchon afin de forcer ladite suspension de l'échantillon à passer à travers lesdits trous de petit diamètre.

8. Dispositif selon la revendication 7, caractérisé en ce que les trous de grand diamètre (46) précités sont placés sur ou au-dessus de la partie supérieure du rotor précité et en ce que les trous de petit diamètre (44) sont placés sur ou en dessous de la partie inférieure dudit rotor.

FIG. 1.

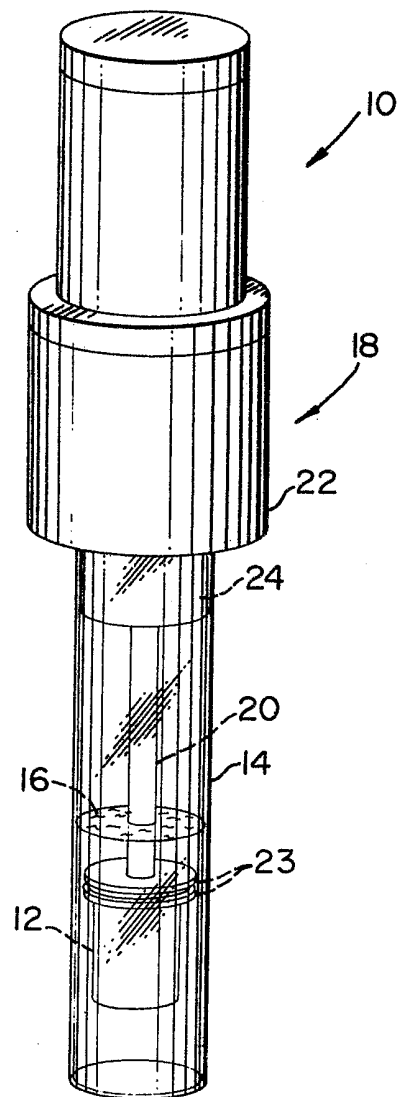


FIG. 2.

